



T.C.

**BATMAN ÜNİVERSİTESİ**  
**LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ**

***In Vitro* ve *In Vivo* YETİŞTİRİLEN  
ANTEPFISTIĞI (*Pistacia vera* L.)'NİN TUZ İLE  
(NaCl) ELİSİTASYONU, ENZİM  
İNİBİSYONU VE ANTİHİPERTANSİF  
AKTİVİTELERİNİN BELİRLENMESİ**

**Zelal EREN**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**  
**Biyoloji Anabilim Dalı**

**Haziran-2021**  
**BATMAN**  
**Her Hakkı Saklıdır**

## TEZ KABUL VE ONAYI

Zelal EREN tarafından hazırlanan “*In vitro* ve *In vivo* yetiştirilen antepfıstığı (*Pistacia vera* L.)’nın tuz (NaCl) ile elisitasyonu, enzim inhibisyonu ve antihipertansif aktivitelerinin belirlenmesi” adlı tez çalışması 30/06/2021 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Batman Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı’nda YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

### Jüri Üyeleri

### İmza

#### Başkan

Prof. Dr. Abdulselam ERTAŞ

#### Danışman

Prof. Dr. Emine AYZAZ TİLKAT

#### Üye

Dr. Öğr. Üyesi İbrahim Selçuk KURU

Yukarıdaki sonucu onaylarım.

Doç. Dr. Ömer Faruk ERTUĞRUL  
Enstitü Müdürü

\*Dr. Mehmet AKDENİZ bu tez çalışmasının ikinci danışmanıdır.

## **TEZ BİLDİRİMİ**

Bu tezdeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edildiğini ve tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını bildiririm.

## **DECLARATION PAGE**

I hereby declare that all information in this document has been obtained and presented in accordance with academic rules and ethical conduct. I also declare that, as required by these rules and conduct, I have fully cited and referenced all material and results that are not original to this work.

Zelal EREN

30.06.2021

## ÖZET

### YÜKSEK LİSANS TEZİ

#### ***In Vitro* ve *In Vivo* YETİŞTİRİLEN ANTEPFISTIĞI (*Pistacia vera* L.)'NİN TUZ İLE (NaCl) ELİSİTASYONU, ENZİM İNHİBİSYONU VE ANTİHIPERTANSİF AKTİVİTELERİNİN BELİRLENMESİ**

Zelal EREN

**Batman Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü  
Biyoloji Anabilim Dalı**

**Danışman: Prof. Dr. Emine AYAZ TILKAT  
Eş Danışman: Dr. Mehmet AKDENİZ**

**2021, 66 Sayfa**

**Jüri**

**Prof. Dr. Emine AYAZ TILKAT  
Prof. Dr. Abdulselam ERTAŞ  
Dr. Öğr. Üyesi İbrahim Selçuk KURU**

Bu çalışmada, *Pistacia vera* L. (Antepfıstığı)'nın tohumları farklı tuz konsantrasyonlarının (0, 50, 150, 250 mM) elisitör olarak kullanıldığı, ancak herhangi bir bitki büyüme düzenleyicisi içermeyen Murashige ve Skoog (MS) besi ortamında bir kontrol grubu ile birlikte çimlendirilmiştir. Kontrol ve elisitasyon grubuna ait kök, gövde ve yaprakları ile *In vivo* (doğal) koşullarda yetişen erkek ve dişi genotiplerine ait kök, gövde ve yapraklarının antihipertansif ve antioksidan aktiviteleri ile enzim inhibisyon aktiviteleri incelenerek karşılaştırılmıştır.

Genel olarak tuz elisitasyonu uygulamalarının biyolojik aktiviteyi kontrol gruplarına oranla arttırdığı, bunun yanı sıra *In vivo* kökenli ekstrelerin *In vitro* kökenli ekstrelerle kıyasla daha yüksek değerlere sahip olduğu tespit edilmiştir. En yüksek antihipertansif aktivite (77,7) *In vivo* dişi yaprak ekstrelerinden elde edilmiştir. Ayrıca, bütirikolinesteraz (BChE) enzim inhibisyonuna karşı *In vivo* kökenli ekstrelerin daha etkili sonuçlara sahip olduğu tespit edilmiştir. Test edilen ekstreler arasında *In vivo* genotiplere ait erkek kök ekstrelerinin hem antiürez (61,98±1,71) hem de antitirozinaz (35,28±0,27) aktivite bakımından güçlü inhibitör etki gösterdiği belirlenmiştir. *In vivo* dişi genotiplerin kök kısımları toplam fenolik içerik (316,79±4,26), ve *In vivo* erkek genotiplerin kök kısımları ise, toplam flavonoid içerik (44,37±1,55) bakımından zengin bulunmuştur. Çalışılan tüm ekstreler, antioksidan test sonuçlarına (DPPH, ABTS ve CUPRAC) göre antioksidan aktivite sergilemiştir. Bununla birlikte, *In vivo* erkek genotiplerin yaprak ekstrelerinin, bütillenmiş hidroksitoluen (BHT) ve a-Tokoferol (a-TOC) standart sonuçlarından önemli ölçüde daha yüksek antioksidan aktivite sergilediği kaydedilmiştir. Dolayısıyla, *P. vera* L.'nin bu tez kapsamında çalışılan kısımlarının farmakolojik çalışmalar için yüksek bir potansiyel teşkil ettiği sonucuna varılmıştır.

**Anahtar Kelimeler:** Antihipertansif, Antioksidan aktivite, Enzim inhibisyonu, Elisitör, *Pistacia vera* L.

## ABSTRACT

### MS THESIS

#### DETERMINATION OF ENZYME INHIBITION, ANTIHYPERTENSIVE ACTIVITIES AND SALT (NaCl) ELICITATION OF *Pistacia vera* L., RAISED *In Vitro* and *In Vivo*

Zelal EREN  
INSTITUTE OF GRADUATE STUDIES OF  
BATMAN UNIVERSITY  
THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE IN BIOLOGY

Advisor: Prof. Dr. Emine AYAZ TILKAT  
Co-Advisor: Dr. Mehmet AKDENİZ

2021, 66 Pages

Jury  
Prof. Dr. Emine AYAZ TILKAT  
Prof. Dr. Abdulselam ERTAŞ  
Assist. Prof. Dr. İbrahim Selçuk KURU

In this study, *Pistacia vera* L. (Pistachio) seeds were germinated with a control group in Murashige and Skoog (MS) medium without any plant growth regulator but under different salt concentrations (0, 50, 150, 250 mM) that used as an elicitor. The antihypertensive properties, antioxidant activities, enzyme inhibition activities of the roots, stems and leaves of the *In vitro* germinated seedlings treated with different salt concentrations, and the same parts of the male and female genotypes grown under natural conditions were compared.

In general, it was determined that salt elicitation applications increased the biological activity compared to the control groups; in addition, *In vivo* extracts had higher values than *In vitro* extracts. The most increased antihypertensive activity (77.7) was obtained from *In vivo* female leaf extracts. In addition, *In vivo* extracts were found to have more effective results against butyrylcholinesterase (BChE) enzyme inhibition. Among the tested extracts, it was determined that male root extracts of *In vivo* genotypes showed a strong inhibitory effect in terms of both antiurease (61.98±1.71) and antityrosinase (35.28±0.27) activities. Furthermore, *In vivo* root parts of female genotypes were rich in total phenolic content (316.79±4.26) and *In vivo* root parts of male genotypes were rich in total flavonoid content (44.37±1.55). All studied extracts exhibited antioxidant activity according to the antioxidant test results (DPPH, ABTS and CUPRAC). However, *In vivo* leaf extracts of male genotypes were noted to exhibit significantly higher antioxidant activity than the standard results of butylated hydroxytoluene (BHT) and  $\alpha$ -Tocopherol ( $\alpha$ -TOC). Therefore, it was concluded that the parts of *P. vera* L. studied within the scope of this thesis constitute a high potential for pharmacological studies.

**Keywords:** Antihypertensive, Antioxidant activity, Enzyme inhibition, Elicitor, *Pistacia vera* L.

## ÖNSÖZ

Tez konumu belirlememde bana yardımcı olan, büyük bir sabırla yol gösteren, çalışmalarımın her aşamasında tüm bilgilerini benimle paylaşan, her türlü konuda desteğini benden hiç esirgemeyen değerli danışman hocam sayın Prof. Dr. Emine AYAZ TİLKAT'a, biyolojik aktivite çalışmalarında gerek bilgi ve tecrübeleriyle katkılarını gördüğüm gerekse de laboratuvar imkânlarını sonuna kadar faydalandıran kıymetli hocam Prof. Dr. Addüselam ERTAŞ'a ve yine biyolojik aktivite çalışmalarında çok değerli yardım ve desteğini hissettiğim ve her aşamasında bilgisine başvurduğum eş danışman hocam sayın Dr. Mehmet AKDENİZ'e, aynı zamanda bilgi ve tecrübeleriyle bilimsel olsun ya da olmasın her konuda bizlere en doğru yolu gösteren, biyoteknoloji laboratuvarından sonuna kadar faydalandıran Botanik Anabilim Dalı Başkan'ı değerli hocam sayın Prof. Dr. Engin TİLKAT'a ve doku kültürü çalışmalarında, beni çalışmaya sürekli teşvik eden ve değerli katkılarını gördüğüm sayın hocam Dr. Öğr. Üyesi Veysel SÜZERER'e sonsuz minnet ve teşekkürlerimi sunarım.

Yüksek lisans eğitimim boyunca ilk günden itibaren, laboratuvar bilgi ve birikimini benimle koşulsuz bir şekilde paylaşan hocam Ayşe HOŞER'e ve laboratuvar arkadaşlarım, Hayri BATIBAY ve Orhan YEL'e de ayrıca teşekkür ederim.

Son olarak beni bugünlere getiren, her türlü maddi ve manevi desteğini benden esirgemeyen canım annem'e, beni tez çalışmalarım boyunca anlayışla karşılayan sevgili kızım Asmin'e ve kıymetli aileme teşekkürü bir borç biliyorum.

**Zelal EREN**  
BATMAN-2021

## İÇİNDEKİLER

ÖZET .....	iv
ABSTRACT.....	v
ÖNSÖZ .....	vi
İÇİNDEKİLER .....	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR .....	viii
1. GİRİŞ .....	1
2. KAYNAK ARAŞTIRMASI .....	4
2.1. <i>P. vera</i> L. Türü Hakkında Genel Bilgiler.....	4
2.2. Bitki Islahında Kullanılan Biyoteknolojik Yöntemler .....	7
2.3. Sekonder Metabolitler ve Rollerini .....	8
2.4. Biyolojik Aktivitelerin Belirlenmesinde Kullanılan Bazı Analitik Teknikler .....	10
2.5. Bazı <i>Pistacia</i> Türleri Üzerinde Yapılan Mikroçoğaltım ve Biyolojik Aktivite Çalışmaları .....	17
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	22
3.1. Bitkisel Materyal.....	22
3.2. Yöntem .....	22
3.2.1. <i>In vitro</i> kültürlerin hazırlanması.....	22
3.2.2. Biyolojik aktivite çalışmaları .....	26
3.2.3. İstatistiksel analiz.....	29
4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA.....	30
4.1. <i>In vitro</i> Çalışmalara Ait Sonuçlar ve Tartışma .....	30
4.2. Biyolojik Aktivite Çalışmalarına Ait Sonuçlar ve Tartışma.....	31
4.2.1. Antihipertansif aktivite sonuçları ve tartışma .....	31
4.2.2. Enzim inhibisyonu aktivitelerine ait sonuçlar ve tartışma .....	33
4.2.3. Toplam fenolik-flavonoid içeriği ve antioksidan aktivitelerine ait sonuçlar ve tartışma.....	37
5.1. Sonuçlar .....	40
5.2. Öneriler.....	41
KAYNAKLAR .....	43
EKLER .....	50

## SİMGELER VE KISALTMALAR

°C	: Santigrat derece
dk	: Dakika
µl	: Mikrolitre
µg	: Mikrogram
M	: Molar
mg	: Miligram
ml	: Mililitre
mM	: Milimolar
nm	: Nanometre
rpm	: Devir/Dakika
s	: Saat
sn	: Saniye
U	: Enzim ünitesi
ACh	: Asetilkolin
ACE	: Anjiyotensin-dönüştürücü enzim
AChE	: Asetilkolinesteraz
AcI	: Asetiltiyokolin iyodür
AH	: Alzheimer Hastalığı
BAP	: 6- benzilaminopürin
BBD	: Bitki büyüme düzenleyicileri
BCh	: Butirilkolin
BChE	: Butirilkolinesteraz
BcI	: Butiriltiyokolin iyodür
BHA	: Bütillenmiş hidroksianisol
DTNB	: 5,5- ditiyobis-(2-nitrobenzoik asit)
E.C.	: Enzim kod numarası
EtOH	: Etil alkol
HCl	: Hidroklorik asit
HT	: Hipertansiyon
HT-29	: Kolon kanseri serisi
HPLC	: Yüksek performanslı sıvı kromatografisi
IBA	: Indol bütirik asit
MCF-7	: Meme kanseri hücre serisi
MTT	: 3-(4,5-dimetiltiyazol2-yl)-2,5-difeniltetrazolyum-bromür
MS	: Murashige ve Skoog
NaOCl	: Sodyum hipoklorit
UV	: Ultraviyole

## 1. GİRİŞ

Antepfıstığı (*Pistacia vera* L.), dünyadaki en popüler ağaç yemişlerinden biridir. “Yeşil altın”, “Meyvelerin kralı”, “Altın ağaç” ve “Kral meyvesi” olarak adlandırılan antepfıstığı (Çağlar ve ark., 2017), dünyada kuzey ve güney yarımkürelerinin 30-45° paralellerinin uygun mikro klimalarında yetişmektedir. Genellikle kuzey yarım kürede, mikro klima olarak ifade edilebilen alanlarda; İran, Suriye ve Türkiye’yi de içeren Doğu Akdeniz ülkeleri, Amerika Birleşik Devletleri, Çin ve Avustralya’nın sıcak ve kurak alanlarında yaygın olarak yetiştirilmektedir. Antepfıstığının iki anavatanı olduğu kabul edilmektedir. Bunlardan birincisi Türkiye, Kafkasya, İran ve Türkmenistan’ın yüksek kısımlarını içine alan Yakın Doğu gen merkezi, diğeri ise Hindistan’ın kuzeyi, Afganistan, Tacikistan ve Pakistan’ı içine alan Orta Asya gen merkezidir. İlk olarak Etiler tarafından Güney Anadolu’da kültüre alındığı bilinmektedir. Anadolu, Kuzey Suriye ve İran’da çok eski zamanlardan beri yetiştiriciliği yapılan antepfıstığının I. yüzyılda Suriye’den İtalya’ya oradan da İspanya, Akdeniz adaları, Güney Fransa ve Kuzey Afrika’ya götürüldüğü bildirilmektedir (Tilkat, 2006; Ertürk ve ark., 2015).

Türkiye, antepfıstığının gen merkezi ve ilk kez kültüre alındığı yer olması dolayısıyla, bu meyve türünün başarılı bir şekilde yetişmesine öncülük etmiş ve ülke ekonomisi bakımından önemli bir yere sahip olan dış ticarete yerini almasını sağlamıştır. Ülkemiz, antepfıstığının mevcut üretimi ve pazarlanması bakımından ABD ve İran’dan sonra dünyada en fazla antepfıstığı üreten ülke konumuna geçmiştir. Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü’nün yayınlamış olduğu rapora göre, 2015, 2016 ve 2017 yıllarının ortalama değerlerine bakılarak dünya fıstık üretiminin %96’sının ABD, İran, Türkiye, Suriye ve Çin ’de üretildiği bildirilmektedir (Karacan ve Ceylan 2020). ABD’de yetiştiriciliğinin %98’i ağırlıklı olarak Kaliforniya eyaletinde yapılmaktadır. Ülkemizde ise, Güneydoğu Anadolu Bölgesi toplam antepfıstığı alanlarının %95’ine sahiptir (Anonim 2014a). Ayrıca Akdeniz, Ege ve hatta İç Anadolu Bölgelerini de kapsayan toplam 44 ilde antepfıstığı yetiştiriciliği yapılmaktadır. Çok sayıda ve değişik tipte antepfıstığı kültürlerinin yapıldığı ülkemizde en çok üretilen antepfıstığı çeşitleri Siirt, Kırmızı, Ohadi, Kellekoçi, Uzun ve Halebi çeşitleridir (Ertürk ve ark., 2015). Türkiye’de fıstık yetiştiriciliği yapılan bölgelerde aşılama en yaygın çoğaltma tekniğidir. Günümüzde Antepfıstığı ağaçlarının geleneksel yöntemlerle çoğaltılması bir anaç fide üzerine ürün veren ağaçlardan alınan çeliklerin aşılması yoluyla yapılmaktadır. Türler dioik olduklarından dolayı dişi ve erkek sürgünlerin aynı

anaç üzerine aşılması yaygın olarak uygulanmaktadır. Yeni ticari çeşitlerin yetiştirilmesi ve klonal anaç yetiştirilmesi için, bitki hücre, doku ve organ kültürü tekniklerinin geliştirilmesine ihtiyaç duyulmaktadır.

Antepfıstığı, Sapindales takımına ait olan mahun cevizi, mango, zehirli sarmaşık ve meşe gibi türleri de barındıran Anacardiaceae familyasının bir üyesidir (Onay ve ark., 2012). Kurak ve yarı kurak alanlarda, nispeten derin, drenajı iyi yapılmış topraklarda rahatlıkla büyüyebilir (Kamali ve Owji 2016). 8-10 m uzunluğunda olabilen çalı ya da ağaçlardır. Dioik bir bitkidir. Erkek ve dişi çiçekler farklı ağaçlarda bulunur (Bozorgi ve ark., 2013). Çiçekler salkım şeklinde olup tozlaşma rüzgârla olur. Erkek ağaçların erken çiçeklenmesi (proteandri) yaygın görülen bir durumdur. Her yıl yaprağını döker ve ağaçlar kış boyunca dormant halde kalır. 5- 8 yıl arasında meyve vermeye başlarken tam randıman 15-20 yıldan önce alınamaz. Meyve tipi drupadır. (Sedefoğlu, 2013).

Antepfıstığı, Pistacia türleri arasında ticari değeri olan ve yenilebilen ürün veren en önemli türdür. %16 karbonhidrat, %25 protein ve %55 yağ içermektedir. Karbonhidrat değeri yüksek tahıllardan daha düşük glisemik indekse sahiptir. Böylece daha uzun süre tokluk hissinin sürdürülmesine ve yemek sonrası kan glikoz konsantrasyonlarının düşürülmesine katkı sağlayarak Tip 2 diyabeti önlemeye yardımcı olur (Kepekçi ve ark., 1991). Yapılan çalışmalarda antioksidan, antimikrobiyal, antienflamatuvar, hipoglisemik, sitotoksik aktivite ve antiaterojenik gibi biyolojik aktiviteleri olduğu tespit edilmiştir (İnci ve Kırbağ, 2019). Doymamış yağ asitleri bakımından yüksek, doymuş yağ asitleri bakımından düşüktür. Antep fıstığı, son zamanlarda antioksidan potansiyeli en yüksek ilk 50 gıda ürünü arasında yer almaktadır ve yüksek antioksidan aktiviteleriyle bilinen zengin bir fenolik bileşik kaynağıdır. Özellikle, antepfıstığının renginden sorumlu bir pigment olan antosiyanin içeren tek kabuklu yemiş olduğu bildirilmiştir (Martorana ve ark., 2013). Yaygın olarak tüketilen badem, ceviz, pekan ve fındık gibi sert kabuklu meyvelerin çoğundan daha yüksek esansiyel aminoasit oranına sahiptir (Çağlar ve ark., 2017).

Günümüzde özellikle biyoteknolojik yöntemler, mevcut bulunan sekonder metabolitlerin hem miktarı ve kalitesinin, hem de çeşidinin arttırılabilmesine olanak sağlayabilmesi açısından sıklıkla kullanılmaktadır. Özellikle elisitör (tuz, ağır metal vb) ve öncül bileşikler, sekonder metabolitlerin miktar ve çeşitlerini arttırabilmesinin yanı sıra iş gücü ve maliyeti de azaltabildiğinden çoğu araştırmacı tarafından tercih edilmektedir. Nitekim elisitör adı verilen bazı stres yapıcı faktörler uygulandığında

sekonder metabolitleri fazla miktarlarda üretmeyen bitki kısımlarından daha yüksek miktarlarda üretimin gerçekleştirilebileceği görülmektedir. Pistacia türlerinin özellikle fenolik ve flavonoid içeriğinden dolayı antihipertansif, antioksidan, antimikrobiyal, anti-enflamatuvar ve sitotoksik etki potansiyeli araştırmacıların ilgisini her zaman çekmiştir.

Bu bağlamda, bu tezde, antepfıstığı tohumlarından *In vitro* şartlarda bir elisitör olarak kullanılan tuz stresi altında (0, 50, 150, 250 mM) tohumların çimlendirilmesiyle elde edilen kök, gövde ve yaprakları ile *In vivo* (doğal) koşullarda yetişen erkek ve dişi genotiplerine ait kök, gövde ve yapraklarının antihipertansif ve antioksidan aktiviteleri ile enzim inhibisyon aktiviteleri incelenerek karşılaştırılmıştır. Ayrıca, denenen parametrelere ait çalışmalar ilk defa bu tez kapsamında gerçekleştirilmiştir.

## 2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

### 2.1. *P. vera* L. Türü Hakkında Genel Bilgiler

#### Anacardiaceae familyası

Çoğu ılıman bölgelerde yetişen, genellikle tüysüz, bir veya çok yıllık otsu bitkilerdir. Genellikle kabukları reçineli ağaçlar veya çalılardır. Yapraklar alternat, basit, trifoliat veya pinnat, stipülsüz, çiçekler uçta veya yaprak koltuklarında panikula durumunda, erdişi veya tek eşeyli, çoğunlukla aktinomorf simetrlili, sepallar 3-5, kaidede birleşmiş veya nadiren hiç yoktur. Petaller 3-5 adet, serbest veya kaidede birleşik veya nadiren hiç yok, stamenler petallerin iki katı kadar, nadiren daha çok veya az, iki halkada dizilmişlerdir. Pistil 1, ovaryum üst durumlu, genellikle bir lokuluslu ve 3 karpelli, nadiren 5 lokulus ve karpelli, ovüller her lokulusta tek, anatrop, plasantasyon parietal veya bazal görünüşlü, meyve drupa'dır (Seçmen ve ark., 2008).

#### *Pistacia* L. cinsi

2 evcikli (dioik), yaprak döken veya herdem yeşil ağaçlar veya çalılardır. Yapraklar pinnat, nadiren trifoliat veya basit yapıdadır. Kaliks 5 parçalı, petaller yoktur. Meyve bir tohumlu drupa'dır. Akdeniz Bölgesinde ve Asya'da yayılış gösteren 20 kadar türü vardır. Ülkemizde 6 türü yayılış gösterir (Seçmen ve ark., 2008).

#### *P. vera* L.'nin sistematikteki yeri

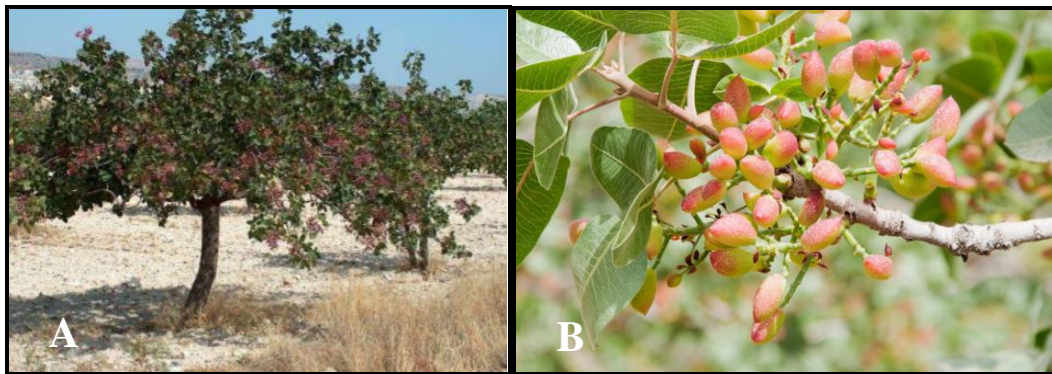
*P. vera*'nın sistematikteki yeri aşağıdaki gibidir;

<b>Âlem</b>	:	Plantae
<b>Altâlem</b>	:	Tracheobionta
<b>Bölüm</b>	:	Magnoliophyta
<b>Sınıf</b>	:	Magnoliopsida
<b>Altsınıf</b>	:	Rosidae
<b>Takım</b>	:	Sapindales
<b>Aile</b>	:	Anacardiaceae
<b>Cins</b>	:	<i>Pistacia</i>
<b>Tür</b>	:	<i>Pistacia vera</i> L.

#### *P. vera* L. 'nin genel özellikleri

Anacardiaceae familyasının bir cinsidir, 9 tür ve 5 alt türe ayrılmaktadır. Bütün *Pistacia* türlerinden damla sakızı ya da nefityağı elde edilebilir. 1-10 m uzunluğunda

olabilen çalı ya da ağaçlardır (Şekil 2.1), yeni çıkan genç dallar çok az bir şekilde tüylüdür. Kışın yaprak döker, yapraklar imparipennat, 10.2-17 cm uzunluğunda 8.4-16 cm genişliğinde ve derimsidir, dalların sonlarında kümelenmiş şekilde bulunurlar; yaprak sapı basık; yaprak ekseni basık fakat kanatsızdır, çok az bir şekilde tüylüdür; yaprakçıklar 3-5, 4-8 cm uzunluğunda, 3-5.5 cm genişliğindedir, ortalama değer 1.6-1, diziliş sıklıkla karşılıklı, yaprakçık şekli ovattan geniş ovata kadar, yaprakçık tepesi obtus ya da mukronulat, orta damar ve kenarlar çok az tüylüdür; uçta bulunan yaprakçık 6-10 cm uzunluğunda, 3-8 cm genişliğinde ve çoğunlukla yanda bulunan yaprakçıktan daha büyüktür. Stamenli çiçekler bileşik salkımlı ve 5 cm ye kadar uzun olabilir, küreciklerden oluşan kümelerdir. Pistilli çiçekler, bileşik salkımlı, 5.5 cm ye kadar uzun çiçeklenme zamanına 2 cm çapında, silindir şeklinde ve çok az bir şekilde tüylüdür. Sert çekirdekli meyveler kırmızımsıtraktan açık yeşile doğru, 18 mm ye kadar uzun 10 mm ye kadar geniş olabilir. Her yaprak tek bir yan tomurcuktan gelişir. Lateral yan tomurcuklar çiçek tomurcuğuna dönüşür ve sonraki yılda ürün veren salkımın ana sapını oluşturur. Bu nedenle Antepfıstıkları yaşlı dallarda meyvelerini oluşturur. Antepfıstığı ağacı dioiktir. Erkek ve dişi çiçekler farklı ağaçlarda bulunur. Bol ve kaliteli bir ürün almak için hem erkek hem de dişi ağaçların bahçede bulunması gerekir. Dişi çiçeklerin taç yaprakları yoktur ve nektar içermez. Bu nedenle, arılar için çekici değildir ve rüzgârlarla dağılan polenler vasıtasıyla tozlanma meydana gelir. Antepfıstığı ağacı her yıl yaprağını döker ve ağaçlar kış boyunca dormant halde kalır. Derin toprak katmanlarına inebilen kök sistemlerine sahip olmaları nedeniyle antepfıstığı ağaçları kurak şartlara uzun süre dayanabilme yeteneğine sahiptirler.



Şekil 2.1. (A) *P. vera* L. ağacı (Şimşek ve Gülsoy, 2018) ve (B) salkımlarının genel görünümü (Hamed ve Lefi, 2015)

Antepfıstığı ağaçlarının gençlik kısırlığı (juvenilite) süresi diğer meyve türlerine göre oldukça uzundur. Genel olarak 5-6. yıldan itibaren çok az miktarda ürün verir.

Maksimum verim miktarına 10-12. yılda ulaşılır. Bu süre, bahçelere yapılan bakıma ve sulama koşullarına göre daha da azalabilir. Antepfıstığı ağaçları güçlü bir apikal dominansi ile dik büyüme gösterir. Daha yaşlı ağaçlarda odun (sürgün) tomurcukları az gelişir. Ağacın bu özellikleri; genç ağaçların iyi bakımı, olgun ağaçların budanması ve daha yaşlı ağaçlarda ürün veren dalların yeniden gençleştirilmesi gerekliliğini ortaya koyar. Şekil 2.2’de görüldüğü gibi ülkemizde antepfıstığı yetiştiriciliği Gaziantep, Şanlıurfa, Siirt, Adıyaman, Kahramanmaraş, Kilis, Diyarbakır, Aydın ve Çanakkale illerinde yapılmaktadır (Şimşek ve Gülsoy, 2018). Yaygın isimleri; Pistachio, Pistache, Fistashka (Rusça), Pista (Farsça), Pistacchio (İtalyanca), Pistacier (Fransızca), Fustuq Halabi (Arapça), Botne (İbranice), Green almond, Pistachier cultivé, Pistazie, Pistazienbaum, Pisutachio, Alfóncigo, Pistachero’dur (Seçmen ve ark., 2008; Onay ve ark., 2012).



Şekil 2.2. *P. vera* L.’nin Türkiye’deki coğrafik dağılışı (Şimşek ve Gülsoy, 2018)

Antepfıstığı yetiştirme alanlarını belirleyen önemli faktörlerden birisi de sıcaklıktır. Yaz aylarında meyvenin gelişmesi ve olgunlaşması için oldukça fazla ve uzun yüksek sıcaklık, kış aylarında ise belli bir süre düşük sıcaklığa ihtiyaç gösterirler. Antepfıstığının yetiştiriciliğinde sıcaklık dört şekilde etkilidir. Bunlar; kış donları, ilkbahar geç donları, kış dinlenmesi ve yaz sıcaklık toplamıdır. Özellikle, sıcaklık toplamının yeterli olmadığı yerlerde meyveler içlerini tamamen dolduramaz, sert kabuk çıtlamaz ve dış kabuk sert kabuktan kolay ayrılmaz. Kaliforniya’da antepfıstığı ağaçlarının en verimli olduğu alanlarda gereksinim duyduğu toplam sıcaklık 2200–2800 gün derece arasındadır. Antepfıstığı ağaçları, kurak koşullara kök sistemleri ile uyum sağlar ve sulama yapılmadan kurak iklimlerde yaşayabilirler. Antepfıstığı yapraklarındaki stomalar, kuru şartlara, diğer ağaçların yapraklarında bulunan stomalardan daha az duyarlıdır. Genellikle nisan ayının ilk iki haftası içinde her bir çiçek salkımında 100-300 çiçek tozlanır ve meyve tutar. Ağustos’un sonu ve Eylül

boyunca meyve olgunlaşır, radyal meyve kabuğu uzun eksen boyunca çıtlar (Onay ve ark., 2012).

## 2.2. Bitki Islahında Kullanılan Biyoteknolojik Yöntemler

Bitki biyoteknolojisi, tarımsal üretimde kayıpları önlemek, verim ve kaliteyi arttırmak, bitki verimliliğini sınırlayan hastalık, zararlıları engellemek, genetik kaynaklarımızı gen ve protein düzeyinde tanımlamak, biyotik ve abiyotik stres koşullarına karşı dayanıklılığın artırılmasını sağlamak amacıyla bitkileri, hayvanları ve mikroorganizmaları modifiye etmek için genetik mühendisliği, moleküler biyoloji, fizyoloji ve biyokimya gibi alanların kullanılmasını sağlayan multidisipliner bir teknolojidir (Kemeç Hürkan, 2020).

Bitkilerde uygulanan biyoteknolojik yöntemler; *In vitro* kültür teknikleri ve genetik manipülasyon teknikleri kapsamında incelenmektedir. Doku kültürü çalışmaları, 1839 yılında Schwan'ın bir organizmanın her bir hücresinin totipotent özelliğinde olduğu kavramını ortaya çıkarması ve çok sayıda hücreden oluşan bir organizmanın yaşayan her bir hücresinin uygun çevre koşulları temin edildiği durumda, bağımsız olarak gelişebilme yeteneğine sahip olduğunu belirlenmesi ile başlamıştır. Totipotent hücre, rejenerasyon ile tam bir organizma geliştirebilme yeteneğine sahip olan hücredir ve bu terim büyük bir olasılıkla 1901 yılında T.H. Morgan tarafından bulunmuş ve kullanılmaya başlanmıştır (Dağüstü, 2018).

Bitki doku kültürü yöntemleri, bitkinin çeşitli kısımlarının (apikal, meristem, kök, yaprak ve gövde gibi doku veya organları), bitki hücrelerinin (meristematik veya kallus hücreleri) ya da tam bir bitkinin aseptik koşullarda ve yapay besin ortamında kültüre alınması işlemleridir (Güven ve Gürsul, 2014). Bitki doku kültürü tekniklerinin bitki ıslahı alanında çeşitli kullanım alanları bulunmaktadır. Bunlar sırasıyla aşağıdaki gibi sınıflandırılırlar;

1. Temel biyolojik araştırmaların yapılması
2. Ekonomik değeri yüksek biyokimyasalların elde edilmesi
3. Mikroçoğaltım yöntemi ile bitki çoğaltma
4. Patojenlerden arınmış bitki eldesi
5. Türler arası melezlerin elde edilmesi
6. Anter ve mikrospor kültürü aracılığı ile haploid bitki eldesi
7. Yeni özelliklere sahip bitkilerin elde edilmesi
8. Transgenik bitkilerin elde edilmesi

9. Protoplast füzyonu ile yeni genotiplerin eldesi

10. Gen kaynaklarının depolanması

11. Hücre kültürlerinin *In vitro* seleksiyon çalışmalarında kullanımı

Doku kültüründe çoğaltım için izlenebilecek her biri çok özel beslenme ve inkübasyon koşulları gerektiren temel dört aşama tanımlamıştır. Bu aşamalar sırasıyla şu şekilde gerçekleşmektedir (Onay ve ark., 2012);

1. Kùltürlerin başlatılması
2. Sürgünlerin çoğaltılması
3. Köklenme
4. Aklimatizasyon

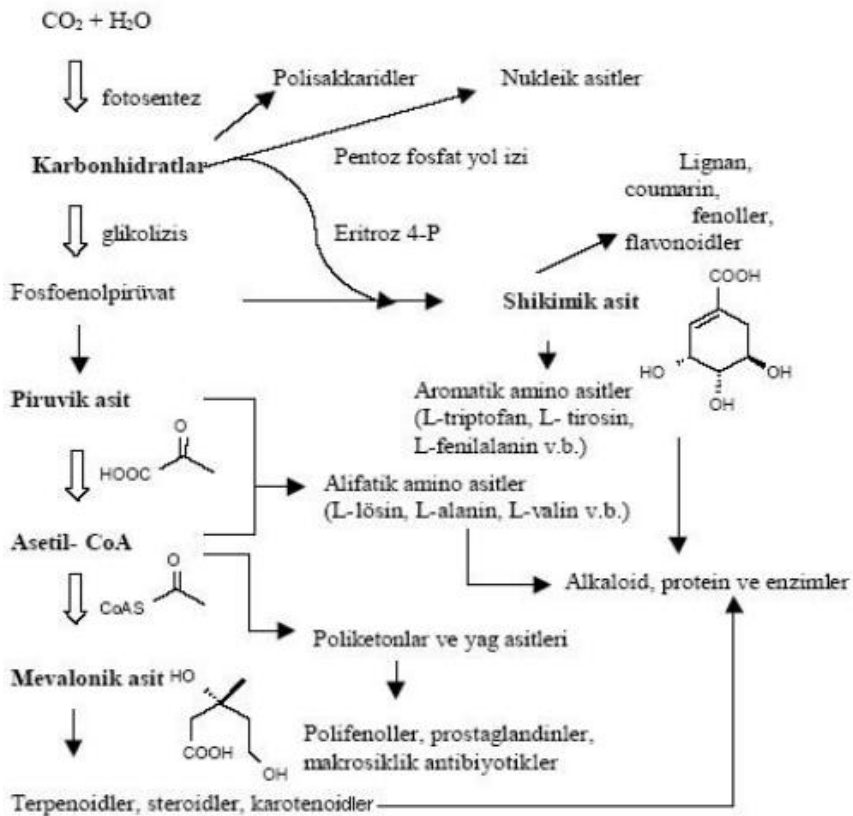
Bitki doku kültürü teknolojisi, büyük ölçekli bitki çoğaltımı için yaygın olarak kullanılmakla birlikte son yıllarda hastalıkların giderilmesi, bitki ıslahı ve sekonder metabolitlerin üretimi alanlarında endüstriyel açıdan büyük önem kazanmıştır. Küçük doku parçaları, sürekli bir işlemle yüzlerce ve binlerce bitki elde etmek amacıyla kullanılabilir. Tek bir eksplant kullanılarak, yıl boyunca mevsim ve hava durumuna bakılmaksızın, kontrollü koşullar altında nispeten kısa bir zaman periyodunda birkaç bin bitkiye çoğaltılabilir. Nesli tükenmekte olan, tehdit altındaki ve nadir türler, mikroçoğaltım teknikleri aracılığıyla başarılı bir şekilde yetiştirilmiş ve korunmuştur (Hussain ve ark., 2012). Bitki doku kültürü yöntemleri ile sekonder metabolit üretimi daha güvenilir, basit ve tahmin edilebilirdir. Normalde ana bitkide bulunmayan bileşiklerin de üretilebilmesine olanak sağlar. Politik, coğrafik ve mevsimsel engellerden bağımsız üretim yapılabilir Karmaşık bitki ekstraksiyonlarıyla karşılaştırıldığında fitokimyasalların izolasyonu daha çabuk ve etkili yapılabilir. Hücre kültürleriyle bitkinin kendisinden elde edilen fitokimyasalların miktarı karşılaştırıldığında hücre kültürlerinden çok daha fazla miktarda ürün elde edilebilir hatta üretim endüstriyel boyuta taşınabilir. Hücre kültüründe genetik uygulamalara yönelik işaretlemeler ve değişimler yapılabilir. Temel araştırmalara (örneğin metabolik ve biyokimyasal yolların anlaşılmasında) yol gösterici tayinler yapılabilir (Yağcı Tüzün, 2011).

### **2.3. Sekonder Metabolitler ve Roller**

İnsanlar tarih boyunca, doğadaki bitkileri farklı işlemlerden geçirmiş ve birçok hastalık için tedavi amacıyla kullanmışlardır. Gelişen teknoloji, yeni üretilen tedavi teknikleri beraberinde gelen yeni ilaçlar olsa da, bu ilaçların beraberinde getirdiği

tehlikeli yan etkiler göz ardı edilemez bir durum olduğundan, bitkiler üzerinde yapılan bilimsel çalışmalara olan ilgi artmış ve biyoaktif özellikleri ile ilgili araştırmalar derinleşmiştir (Demir ve Akpınar, 2020).

Sekonder metabolitler, bitkinin normal büyüme ve gelişmesi için ihtiyaç duymadığı ancak hücre metabolizmasının yan ürünü olarak bitkilerde üretilen kimyasal bileşiklerdir (Şekil 2.3). Bitki sekonder metabolitlerinin temel özelliklerinden biri benzersiz karbon iskelet yapılarının olmasıdır. Sekonder metabolitlerin oluşumu genellikle organ, doku ve hücreye özgüdür ve genellikle düşük moleküler ağırlıklı bileşiklerdir (Bakır, 2020). Yapı ve fonksiyonları birbirinden farklı 50.000 den fazla sekonder metabolit mevcuttur. Bunlar; alkaloidler, uçucu yağlar, fenoller, glikozitler, heterozitler, steroidler, saponinler, flavonoidler, tanenler, renk maddeleri ve reçineler olup, genel olarak alkaloidler, terpenoidler ve fenoller olmak üzere üç temel grupta sınıflandırılırlar (Çalışkan ve ark., 2019). Bu kimyasallar başta ilaç sanayisinin hammaddesi olup kozmetik, besin katkı maddesi, zirai ilaç sanayiinde ve birçok kimya sektöründe kullanılmaktadır. Sekonder metabolitlerin kullanım alanlarını ilaç hammaddesi, besin katkı maddesi, zirai ve kozmetik alanda kullanılan sekonder metabolitler şeklinde sıralayabiliriz (Yılmaz, 2011).



Şekil 2.3. Sekonder metabolitlerin sentez yolları (Oskay ve Oskay, 2009)

Sekonder metabolitler, stres koşullarında yüksek oranda indüklenebilen farklı metabolit ailelerinin geniş bir yelpazesidir. Bitki sekonder metabolitlerinin bitkideki fonksiyonları tartışmalı olsa da bitkiyi her türlü saldırıya karşı koruduğu, aynı ortamdaki diğer bitkilerle rekabet güçlerini artırdığı, tozlaşmada rol oynadığı, abiotik stress faktörlerine karşı koruduğu sayılabilir (Oskay ve Oskay, 2009).

#### **2.4. Biyolojik Aktivitelerin Belirlenmesinde Kullanılan Bazı Analitik Teknikler**

##### **Hipertansiyon ve antihipertansif etki**

Hipertansiyon (HT), ciddi komplikasyonlara neden olması ve toplumda sık görülmesi nedeniyle önemli bir halk sağlığı sorunudur. Son yıllarda ilaç tedavisinde sağlanan önemli gelişmelere rağmen hipertansiyon, gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerin en önemli sağlık sorunlarından biri olmaya devam etmektedir (Aydın ve Öztürk, 2014). Arteriyel kan basıncının normal sayılan sınırların üzerine çıkmasına hipertansiyon denir. Dünya Sağlık Örgütü'ne göre; sistolik kan basıncının (SKB) 140 mmHg, diyastolik kan basıncının (DKB) da 90 mmHg veya üzerinde bulunması HT olarak tanımlanmaktadır.

HT, başta kardiyovasküler sistem olmak üzere birçok sistemi etkileyen sinsi seyreden ölümcül ama tedavi edilebilir bir hastalıktır. Dünyada 9.4 milyon ölüm ve hastalık yükünün %7'sinin hipertansiyon kaynaklı olduğu tahmin edilmektedir. Türk Hipertansiyon Prevalans (Patent2) raporuna göre, ülkemizde hipertansiyonun görülme sıklığı %31.8 olarak bildirilmiştir. Altmış yaşından sonra hipertansiyon prevalansı %60-80'lere kadar yükselmektedir. Tedavi edilmediğinde kalp yetersizliği, böbrek yetersizliği, felç, görme kaybı gibi pek çok hastalığa neden olabilmektedir. Ayrıca bu hastalık bütün ölümlerin %20-50'sine sebep olan kardiyovasküler mortalitenin temel risk faktörlerindedir (Erci ve ark., 2018). Tedavisi için beslenme ve ilaç tedavisinin birlikte yürütülmesi gerekmektedir. Diyetin ayarlanarak vücut ağırlığının kontrolü, sigaranın bırakılması, stresten uzak durulması, alkollü içkilerden vazgeçilmesi, tuz alımının azaltılması, sebze ve meyve tüketiminin artırılması, doymuş ve toplam yağ alımının azaltılarak dengelenmesi, fiziksel aktivitenin artırılması gibi yaşam tarzı değişikliklerinin hipertansiyonun önlenmesinde ve tedavisinde yeri önemlidir (Ekim, 2018).

Amerika kaynaklı Birleşik Ulusal Komite (Joint National Comitee)'nin 2013 Aralık ayında yayınlanan sekizinci kılavuzunda (JNC 8) ise 60 yaş altındaki

popülasyonda SKB  $\geq 140$  mmHg ve/veya DKB  $\geq 90$  mmHg olan “tüm” hastalarda ilaç başlanması önerilmektedir. 60 yaş üstündeki hastalarda tedaviye SKB  $\geq 150$  mm ve/veya DKB  $\geq 90$  mmHg ise başlanması ve tedavi hedefinin de kan basıncının bu değerler altına düşürülmesi olduğu belirtilmiştir. Tedavi bazında 5 grup ilaçtan herhangi birinin veya bunların ikili kombinasyonunun seçilebileceğini önerilmektedir. Bu 5 grup ilaç, diüretikler (tiyazid grubu, klortalidon, indapamid), beta blokörler (60 yaşın altındaki hastalarda), kalsiyum kanal blokörleri (KKB) (nifedipin, amlodipine, verapamil, diltiazem vs.), anjiotensin dönüştürücü enzim (ACE) inhibitörleri (kaptopril, enalapril, lizinopril, ramipril, zofenopril vs.) ve anjiotensin reseptör blokörlerinden (ARB) (losartan, valsartan, kandesartan, olmesartan vs.) oluşmaktadır. Ancak öte yandan, bazı hasta gruplarında bazı ilaç gruplarının yararının az olduğu veya yan etki profilinin daha fazla olduğunu gösteren çalışmalar ışığında ilaç seçiminde bazı noktaları göz önünde bulundurmak gerekir. Hâlbuki mevcut ilaçların tek başına kullanıldıklarında ideal bir antihipertansiften öngörülen beklentilerin tümünü karşılayamadığı bunun yerine kombine tedavinin daha avantajlı olduğu da belirtilmiştir (Anonim, 2014b).

### **Alzheimer hastalığı ve kolinesteraz enzimleri (AChE, BChE)**

Alzheimer hastalığı (AH), merkezi sinir sisteminin (MSS) nörodejeneratif bir hastalıdır. Psikiyatrik olarak diğer bilişsel işlevlerin yanı sıra hafızanın ilerleyen bozuklukları ve günlük yaşamda artan bir özerklik kaybı ile karakterize edilmektedir (Akdağ ve ark., 2019).

Bunamanın en yaygın nedenidir ve küresel olarak her yedi saniyede bir ortaya çıkan yeni bir vaka ile hastalığın kendisi yavaş bir pandemi haline gelmektedir. Altmış yaşındaki popülasyonda yaklaşık %1 olan AH'nın prevalansı, sonraki her beş yılda ikiye katlanarak 85 yaş ve üstü grupta oranı %35-45'e ulaşır. En büyük risk faktörü ilerleyen yaştır. Ancak bu hastalığın, yaşlanma sürecinin doğal ve kaçınılmaz bir sonucu olmadığını vurgulamak gerekir. Pozitif aile öyküsü, kafa travması, depresyon, diyabet, cinsiyet, eğitim düzeyi, down sendromu, hipertansiyon, alkol ve sigara gibi faktörlerin de hastalık riskini arttırdığı bildirilmiştir (Anand ve ark., 2014). Menopoz sonrası östrojen kullanan kadınlarda, kullanmayanlara göre AH gelişim oranının daha az olduğu görülmüştür. Ölüm nedeni istatistiklerine göre AH'dan hayatını kaybeden yaşlıların sayısı, 2012 yılında 7.524 (%3.4) iken 2016 yılında 12.900 (%4.5)'e yükselmiştir. AH'ından ölen yaşlıların oranı cinsiyete göre incelendiğinde, her iki cinsiyette de artış olduğu görülmektedir. AH'ından ölen yaşlıların oranı 2012 yılında erkeklerde %2.9,

kadınlarda %4.5 iken bu oranlar 2016 yılında erkeklerde %3.5'e, kadınlarda ise %5.4'e yükselmiştir (Erbek, 2019).

AH'nın en belirgin semptomları; kişinin günlük yaşantısını etkileyen hafıza kaybı, planlama ve problem çözmede zorlanması, evde, işte veya boş vakitlerinde sürekli yaptığı işleri artık yapamaması, yer ve zamanı karıştırması, görsel ve mekânsal ilişkileri anlamada sorun yaşaması, konuşma ve yazı yazma problemleri ile karşılaşması, eşyaları kaybetmesi, karar verememesi, sosyal aktivitelerden ve iş yaşantısından kendisini soyutlaması, duygu durum ve kişiliğinde değişiklikler olmasıdır.

AH'nın günümüzde kesin tedavisi yoktur. Kullanılan tedaviler hastalık seyrini kısmen yavaşlatmaya yönelik semptomatik tedavilerdir. Asetilkolin (ACh)'in beyinin bellek ile ilgili bölgelerinde önemli bir nörotransmitter olduğu ve AH'nda ACh azalmasının bellek bozukluğu ile ilişkili olduğu belirtilmiştir. Bu bağlamda davranışlarda meydana gelen değişimleri azaltmak için kolinesteraz inhibitörleri, antipsikotik ilaçlar, antidepresanlar ve uykuyu düzenlemek için çeşitli ilaçlar verilmektedir. Kolinesteraz (AChE, BChE) inhibitörlerinin AH'nın tedavisinde kullanımı ilk olarak Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (US Food and Drug Administration, FDA) tarafından kanıtlanmıştır. Alzheimer hastalarındaki tedavi edici etkileri 6 ile 36 hafta arasındaki tedavi süresince incelenmiş ve bilişsel fonksiyonlarındaki artış gözlenmiştir. Ayrıca destekleyici olarak E vitamini, selegiline ve hydergine gibi ilaçlar da hastalığın tıbbi tedavisinde kullanılmaktadır (Erbek, 2019).

### **Tirozin ve antitirozinaz enzimi**

Tirozinaz veya polifenol oksidaz (EC 1.14.18.1), bitkiler ve hayvanlar âleminde yaygın olan çok işlevli, bakır içeren bir enzimdir. Melanin oluşumunda rol oynar. Melanositler içindeki melanogenez sürecini büyük ölçüde etkileyen anahtar bir düzenleyicidir. Melaninin iki formu; feomelanin (sarı/kırmızı) ve ömelanin (kahverengi/siyah) olup dünyadaki etnik deri rengi farklılıklarının temel nedeni olarak kabul edilmektedir. "Melanin" adı, eski Yunanca'da karanlık anlamına gelen "melanos" kelimesinden gelir. Deri dış ortamla temas ettiğinden dolayı vücudumuzun önemli bir koruyucusudur. Derinin epidermal tabakasında melanositler tarafından melanin salgılanması anlamına gelen ve tirozinazla başlatılan melanogenesis derinin koyulaşmasına neden olur. Farklı biyopolimerlerin bir karışımı olan melanin, cildin ve saçın rengini belirlediği gibi zararlı UV radyasyonundan da koruma sağlar. Aşırı üretim ve deride melanin pigmentinin birikmesi, solar lentigo, melazma, iltihap sonrası

hiperpigmentasyon (PIH) ve linea nigra gibi klinik durumlarda ortaya çıkan dermatolojik "hiperpigmentasyon" gelişimine yol açar. Vücuttaki hormonal dengesizlik, yani Cushing hastalığı, Addison hastalığı ve Nelson sendromu nedeniyle de ortaya çıkabilir. Arbutin ve kojik asit, cilt beyazlatma için kozmetik ürünlerde yaygın olarak kullanılan bilinen tirozinaz inhibitörleridir. Klinik olarak, bu pigment giderici ajanlar hiperpigmentasyon tedavisi için uygulanır. Bununla birlikte, Kojik asit terapötik konsantrasyonda dermal duyarlılığa neden olurken, arbutin potansiyel sitotoksositeye sahiptir (Mukherjee, ve ark., 2018; Sarkar ve ark., 2013; Burnett ve ark., 2010).

Tirozinaz inhibitörleri aynı zamanda kozmetik alanda beyazlatıcı olarak yaygın şekilde kullanılmaktadır. Dünya nüfusunun yaklaşık %15'i cilt beyazlatma ajanları kullanmaktadır. Hindistan, Japonya ve Çin, cilt beyazlatma ajanlarının tüketildiği küresel merkezdir (Pillaiyar ve ark., 2017). Tirozinaz ayrıca meyve ve sebzelerde enzimatik esmerleşme reaksiyonlarından sorumludur. Esmerleşme genellikle bitki kaynaklı gıda ürünlerinin rengine zarar verir, bu da besin kalitesinin bozulduğunu gösterebilir. Gıdalardaki bu aşırı-tirozinaz aktivitesi, tirozinaz inhibitörleri kullanılarak önlenir (Mukherjee ve ark., 2018). Hem doğal hem de sentetik kaynaklardan birçok tirozinaz inhibitörü tanımlanmıştır. Tirozinaz inhibitörleri, enzim substratı olarak L-tirozin veya L-dopa'nın varlığında incelenir ve dopakrom oluşumu açısından aktivite değerlendirilir. Tirozinaz inhibitörü olarak kullanılan bazı ilaçların toksik olması nedeniyle doğal tirozinaz inhibitörlerinin önemi ortaya çıkmıştır. Tıbbi bitkilerden çeşitli tirozinaz inhibitörleri geliştirilmiştir, ancak bu çeşitli bitkilerin potansiyel pigment giderme ajanları olarak kullanıldığı çalışmalar hala devam etmektedir.

### **Üre ve antiürez enzimi**

Ürez enzimi (üre amidohidrolaz E.C. 3.5.1.5) hidrolazlar sınıfından bir enzim olup, üreyi amonyak ve karbondioksit hidroliz eden nikel bağlı bir metalloenzimdir. Ürezlerin temel görevi organizmaların dışarıdan aldığı veya içinde ürettiği üreyi azot kaynağı olarak kullanmasını sağlamaktır (Örnek Acar, 2009). Küçük bir molekül olan üre, ürezin doğal substratıdır. Ürenin amonyak ve karbondioksit parçalanmasını katalizler. Enzimin aktif bölgesinde yer alan 2 nikel atomunun reaksiyonda önemli rol oynadığı bildirilmiştir (Zehir Kırkbir, 2018). Enzim olmadan gerçekleşen reaksiyonda oluşan ürünler amonyak ve siyanürik asit iken enzim varlığında gerçekleşen reaksiyonda ise ürünler, amonyak ve karbonik asit olmakta ve ayrıca ürez enzimi ile bu işlem normal reaksiyonlara göre 1014 kat daha hızlı kataliz edilmektedir (Real-Guerra ve ark., 2013; Hirayama ve ark., 2000).

Üreaz birçok bitki, alg, lifli mantar ve bakteride yer alır ve tabiattaki azot döngüsünde önemli bir rol oynar (Bilgin Sökmen ve ark., 2016). Üreaz ayrıca çeşitli patojenik bakterilerde bulunan bir virülans faktörüdür. Bu nedenle, bir konakçı organizmanın kolonizasyonunda ve dokulardaki bakteri hücrelerinin korunmasında gerekli olması şaşırtıcı değildir. Üreaz inhibitörleri genellikle, üre hidrolizini yavaşlatmak için enzimin aktif bölgesini inhibe ederek çalışır. Üreaz inhibitörleri iki ana kategoriye ayrılır; metal kompleksler ve organik bileşikler. Çözünmez sülfid oluşturan metaller, üreazın sülfhidril grupları ile reaksiyonlara bağlı olarak en güçlü inhibisyon özelliklerini sergiler (Upadhyay, 2012). Aktivitesi, üriner taşların ortaya çıkması, kateterlerin tıkanması, piyelonefrit, amonyak ensefalopati, hepatik koma ve gastrit gibi çeşitli sonuçlara yol açmaktadır.

En sık incelenen bakteriyel üreazlardan biri, gastrit ve peptik ülserasyon ve mide kanserine neden olan bir ajan olan *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) 'den kaynaklanmaktadır. Peptik ülser dünya çapında oldukça yaygın bir hastalıktır. Amerika Birleşik Devletlerinde her yıl yaklaşık 1.000.000'dan fazla kişi peptik ülser rahatsızlığı nedeniyle tedavi altına alınmaktadır. *H. Pylori*, midedeki mukus tabakası içerisinde bulunmaktadır. *H. pylori* üreaz enzimi salgılayarak üreyi amonyağa dönüştürür ve ürettiği amonyak ile kendini mide asidinin etkisinden korur. Midede üreaz varlığı 20. yüzyılın başlarında keşfedilmiştir. Üreazın değişken ve önemli rolü, bu enzimin genetik, biyokimya ve fizyoloji alanlarında dünya çapındaki araştırmacıların odak noktası olmaya devam etmesini teşvik etmiştir (Kafarski ve Talma, 2018). Üreaz, diyaliz makinelerinde ürenin kandan uzaklaştırılması ve kandaki üre miktarının tayin edilmesi gibi klinik çalışmalarda ve atık sulardaki ürenin temizlenmesi işlemlerinde de kullanılır. Üre, dünya çapındaki toplam azotlu gübre tüketiminde önemli bir yer tutmaktadır. Leguminosae ailesinin pek çok çeşidine ait tohumlarında yüksek üreaz aktivitesine rastlanmıştır.

### **Antioksidanlar**

Antioksidanlar, diğer moleküllerin oksidasyonunun neden olduğu hücresel hasarı önleyen moleküllerdir. Oksidasyon, elektronları bir molekülden oksitleyici bir maddeye aktaran kimyasal bir reaksiyondur. Oksidasyon reaksiyonlarının serbest radikaller ürettiği bilinmektedir. Bu serbest radikaller, en dış kabuklarında bir veya daha fazla eşleşmemiş elektron içeren oldukça reaktif türlerdir. Oluştuktan sonra zincirleme reaksiyon başlar. Antioksidanlar, bu serbest radikallerle reaksiyona girer ve serbest

radikal ara ürünlerini uzaklaştırarak bu zincirleme reaksiyonu sonlandırır ve kendilerini oksitleyerek diğer oksidasyon reaksiyonlarını engeller.

Oksidasyon reaksiyonları yaşam için çok önemli olsa da, zararlı da olabilir. Bitkiler ve hayvanlar, C vitamini ve E vitamini gibi birden çok antioksidan türünün yanı sıra katalaz (CAT), süperoksit dismutaz (SOD) ve çeşitli peroksidazlar gibi enzimlerden oluşan karmaşık bir sisteme sahiptir (Hamid ve ark., 2010). Oksidatif stres, hücresel nekroz, kardiyovasküler hastalık, kanser, nörolojik bozukluk, Parkinson demansı, AH, inflamatuvar hastalık, kas distrofisi, karaciğer bozukluğu ve hatta yaşlanma gibi çeşitli insan hastalıklarına neden olmada önemli bir rol oynar (Amit ve Priyadarsini, 2011). Ayrıca E vitamini,  $\beta$ -karoten ve C vitamini gibi vücudun kendisi tarafından üretilmeyen mikro besin formunda bazı antioksidanlar da vardır ve bu nedenle bunların normal diyetle takviye edilmesi gerekir (Teresa ve ark., 2011).

### **Antioksidanların Sınıflandırılması**

Antioksidanlar, kaynaklarına göre doğal ve sentetik antioksidanlar olmak üzere iki ana tipte sınıflandırılabilir.

#### **Doğal Antioksidanlar**

Doğal antioksidanlar metabolik süreçle sentezlenir ya da diğer doğal kaynaklardan desteklenir. Aktiviteleri büyük ölçüde fiziksel ve kimyasal özelliklerine ve etki mekanizmalarına bağlıdır. Enzimatik antioksidanlar ve enzimatik olmayan antioksidanlar şeklinde iki kategoriye ayrılır. Süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT) ve glutatyon peroksidaz (GPx) enzimatik antioksidanlara örnek verilebilirken, mineraller (Fe, Mg, Se, Cu, Mn), vitaminler, karotenoidler, polifenoller ve diğer antioksidanlar ise enzimatik olmayan antioksidanlardır.

Polifenoller, belirgin antioksidan aktivitelere sahip bir fitokimyasal sınıftır. Antioksidan aktiviteleri, moleküler yapılarına bağlı olarak metabolizmayı düzenleyen kimyasal ve fiziksel özelliklerine bağlıdır (Ajila ve ark., 2011). Bunlar fenolik asitler, flavonoidler, gingerol, kurkumin vb. içerir (Amit ve Priyadarsini, 2011). Flavonoid, ana polifenolik bileşik sınıftır ve çoğunlukla sebzelerde, meyvelerde, tahıllarda, tohumlarda, yapraklarda, çiçeklerde, ağaç kabuğunda vb. bulunur. Zencefil ve zerdeçal gibi baharatların bazıları da iyi polifenolik bileşik kaynaklarıdır, örn. Gingerol, zencefilin rizomlarından elde edilirken, kurkumin (diferuloylmethane) zerdeçalın ana biyoaktif bileşenidir ve iyi bir antioksidan aktiviteye sahip olduğu bilinmektedir. Kurkuminin lipid peroksidasyonunu inhibe ettiği ve epitel hücrelerinde

de GSH seviyelerini arttırdığı ve bu da daha düşük ROS üretimine yol açtığı gösterilmiştir (Biswas ve ark., 2005).

### **Sentetik antioksidanlar**

Çeşitli teknikler kullanılarak yapay olarak üretilir veya sentezlenir. Temelde polifenolik bileşikler, esas olarak serbest radikalleri yakalayan ve zincirleme reaksiyonları durduran bileşiklerdir. Polifenolik türevler genellikle daha fazla hidroksil veya metoksi grubu içerir. Bilinen bazı sentetik antioksidanlar; bütillenmiş hidroksianisol (BHA), bütillenmiş hidroksitoluen (BHT) ve etilendiamintetraasetik asit (EDTA)'tir.

## 2.5. Bazı *Pistacia* Türleri Üzerinde Yapılan Mikroçoğaltım ve Biyolojik Aktivite Çalışmaları

**Tilkat ve ark. (2008)**, *P. vera* L. cv. atlı çeşidinin mikroçoğaltımı üzerine etki eden faktörleri incelemişler ve en fazla sürgün oluşumunu ( $5.64 \pm 0.07$ ), 1.0 mg/l BA ile desteklenen Murashige ve Skoog (MS) besiyerinde kültürlemeden 4 hafta sonra elde etmişlerdir. IBA'nın, kök oluşumunu teşvik etmede en etkili hormon olduğunu ve en yüksek köklenme oranının %73 ile kültürlemeden 4 hafta sonra, 4.0 cm uzunluğundaki eksplantlardan alındığını, ayrıca köklenmiş sürgünlerin toprağa alıştırma sürecinde fidelerin %90 oranında hayatta kaldığını belirtmişlerdir.

**Benmahioul ve ark. (2009)**, antepfıstığının tuzluluk toleransını incelemek için olgun tohumlardan geliştirdikleri embriyoları izole etmiş ve 30 gün boyunca farklı tuz konsantrasyonları altında *In vitro* olarak kültüre almışlardır. Çimlenem embriyoların hayatta kalma oranlarının, kontrol gruplarında %100 olduğunu, ancak en yüksek tuz konsantrasyonunun (256.6 mM) uygulandığı gruplarda ise %62.9'a düştüğünü, bunun yanı sıra, toprak üstü ve kök kısımlarının uzunluğu, embriyo başına üretilen yaprak sayısı ve ayrıca hem toprak üstü kısımlar hem de kökler için toplam taze ve kuru madde ağırlıklarının da denenen tuz konsantrasyonlarına göre önemli farklılıklar gösterdiğini belirtmişlerdir.

**Peksel ve ark. (2010)**, çalışmalarında, *atlantica* Desf.'nin ilkbaharda toplanan genç yapraklarından metanolik ve etil asetat ekstraları hazırlamış ve bunların antioksidan, süpürücü, şelatlayıcı ve anti- AChE aktivitelerini değerlendirmişlerdir. Her iki ekstrenin, bütillenmiş hidroksianisol ve bütillenmiş hidroksitoluen gibi sentetik antioksidanlara oranla güçlü antioksidan aktivite gösterdiğini, nispeten daha düşük seviyede ise anti- AChE aktivitesi sergilediklerini rapor etmişlerdir. Etilasetat ekstralarının AChE inhibe edici etkisinin, metanol ekstralarından daha yüksek inhibitör etkisine sahip olduğunu bu bağlamda gıda ve farmasötik ürünler için potansiyel bir antioksidan takviyesi olabileceğini bildirmişlerdir.

**Benmahioul ve ark. (2012)**, antepfıstığında etkili bir mikroçoğaltım tekniği geliştirerek, en yüksek sürgün çoğaltma sıklığını, Gamborg (B5) vitaminleri içeren ve 4 mg/l 6-benziladenin (BA) içeren MS bazal ortamında kültürlenen nodal eksplantlardan; en yüksek *ex vitro* köklenmeyi ise, sürgün eksplantlarının Rhizopon® %2 indol-3-butirik asit (IBA) ile işlemine tabi tutulduktan sonra elde etmişlerdir. Köklenmiş bitkileri, önce turba-perlit-vermikülit (1:1:1) karışımı içeren plastik kaplara, daha sonra

seraya aktarmış ve 2 ay sonra köklenmiş sürgünlerin %81.5 oranında hayatta kaldığını rapor etmişlerdir.

**Sehitoglu ve ark. (2015)**, antioksidan özelliklerini incelemek amacıyla antepfıstığı reçineleri üzerine yaptıkları çalışmada, linoleik asit peroksidasyonunu, 10 µg/ml konsantrasyonda %54.2 inhibe ettiğini, öte yandan, antioksidan bileşikler olan BHA, BHT, α-tokoferol ve troloxun, linoleik asit peroksidasyonunu yine aynı konsantrasyonda sırasıyla %80.3, %73.5, %36.2 ve %72.0 oranlarında inhibe ettiğini saptamışlardır.

**Uddin ve ark. (2015)**, *P. atlantica* ssp. *cabulica* Stocks., alttürüne üreaz inhibisyonu ve kimyasal bileşenleri üzerine yaptıkları çalışmada kullanılan ham ekstrelerin etil asetat fraksiyonu, 0.2 mg/mL'de 19.9±0.51 µg/mL IC<sub>50</sub> değerleri ile %100 üreaz inhibisyonu gösterdiğini, bununla birlikte, n-heksan ve kloroform fraksiyonlarının ise önemsiz seviyede üreaz inhibisyonu sergilediğini bildirmişlerdir.

**Şermet (2015)**, *P. vera* bitkisinin kabuğunun antioksidan kapasitesi, antimikrobiyal etkileri ve fenolik bileşiklerin araştırılması üzerine yaptığı çalışmada, DPPH EC<sub>50</sub> değeri 0.0375±0.006 mg/ml, toplam fenolik madde miktarının 145.32±7.14 mg ve toplam flavonoid miktarının 92.74±9.24 µg olarak hesaplandığını dolayısıyla kromatografik (LC-MS/MS) analizlerin, *P. vera*'nın quercetin ve gallik asit açısından oldukça zengin kaynaklar olduğunu son olarak en etkili antimikrobiyal aktivitesinin *S.aureus*'a karşı gözlemlendiğini bildirmişlerdir.

**Delijam ve ark. (2016)**, İran'da yetişen *P. vera* L. cv ghazvini çeşidi için etkili bir mikroçoğaltım protokolü geliştirilmişlerdir. Farklı vitaminler, kalsiyum (Ca) kaynakları ve bitki büyüme düzenleyicileri (PGR'ler)nin, *In vitro* sürgün çoğaltma ve kök oluşumu üzerine etkilerini araştırdıkları çalışmada, GNH besi ortamının sürgün sayısını, MS, McCown Woody Plant Medium (WPM) ve Juglans Medium (DKW) besiyerlerine kıyasla önemli ölçüde arttırdığını, en uygun Ca konsantrasyonunun 3.0 mM Ca glukonat ve vitamin kaynağının ise DKW olduğunu, yine en uygun PGR'lerin, 0.5 veya 1.0 mg/l BAP ve 0.1 mg/l IBA kombinasyonlarından elde edildiğini ve en yüksek köklenmenin ise, 2.0 mg/l a-naftalenasetik asit (NAA) içeren GNH ortamına 3.0 mM Ca glukonat veya Fe-EDDHA (0.2 mM Fe) eklendiğinde oluştuğunu bildirmişlerdir. Son olarak, elde edilen fidelerin yaklaşık %70'inin serada iklimlendirme şartlarında hayatta kaldığını da rapor etmişlerdir.

**Ahmed ve ark. (2018)**, *P. atlantica* yapraklarının tip 2 diyabet (α-amilaz ve α-glukozidaz) ve hipertansiyona (anjiyotensin dönüştürücü enzim-I (ACE-I)) bağlı

enzimleri inhibe etme kabiliyetindeki varyasyonlarını araştırdıkları çalışmalarında, *P. atlantica* yaprak ekstrelerinin LC parmak izleri geliştirmişler ve anti-amilaz, anti-glukosidaz ve anti-ACE-I aktivitelerinden sorumlu olan pikleri belirlemişlerdir. Kromatogramlardan seçtikleri on üç ortak piki biyolojik aktiviteleri modellemek için bir veri seti olarak kullanmışlardır. Yedi pikin anti-amilaz bileşiklerine karşılık geldiğini, altı pikin a-glukosidaz aktivitesini inhibe etmek için önemli olduğu, sekiz pikin ise ACE-I aktivitesini inhibe etmek için önemli olduğunu tespit ettikleri çalışmalarında *P. atlantica* yapraklarının, içerdiği fenolik bileşiklerinin antidiyabetik ve antihipertansif ajanların izolasyonu ve geliştirilmesi için bir potansiyel olduğunu rapor etmişlerdir.

**Yemmen ve ark. (2017)**, Tunus'ta yetişen Sakız ağacının (*P. lentiscus*) meyve ve kökleri üzerine yaptıkları çalışmalarında, polifenol ve antioksidan aktivite bakımından yaprak ekstrelerinden alınan sonuçların maksimum düzeyde olduğunu, güçlü bir sitotoksik ve antiproliferatif özellik gösterdiği, ayrıca yaprak, meyve ve gövdesinde tanik asit, gallik asit, digalloil kinik asit türevi, kuersetin ve p-kumarik asidi gibi fenolik bileşiklerin varlığını da rapor etmişlerdir.

**Benamar ve ark. (2018)**, *P. atlantica* subsp. *atlantica* yapraklarını kullanarak antioksidan ve AChE aktivitelerini araştırdıkları çalışmalarında, etil asetat ekstrelerinin en yüksek toplam fenolik, flavonoid içeriğine ve en yüksek antioksidan aktiviteye sahip olduğunu gözlemlemişlerdir. Sulu, etil asetat ve bütanol ekstrelerinin birkaç pozitif bölge gösterdiğini, ayrıca etil asetat ve sulu ekstrelerin ise, AChE'nin en iyi inhibe edici aktivitesini gerçekleştirdiğini bildirmişlerdir.

**Rahman (2018)**, *P. atlantica* subsp. *kurdica* sakızlarının toplam fenol ve flavonoid içeriği ile serbest radikal süpürücü aktivitelerini araştırdıkları çalışmalarında, toplam fenolik içeriğinin  $147.11 \pm 0.25$ , flavonoid içeriğinin  $45.55 \pm 3.2$  seviyelerinde olduğunu,  $2,5 \mu\text{g/mL}$   $\text{IC}_{50}$  değeriyle  $100 \mu\text{g/mL}$ 'de %95.56 DPPH süpürme aktivitesi gösterdiğini,  $500 \mu\text{g/mL}$   $\text{IC}_{50}$  değeri ile  $2.400 \mu\text{g/mL}$ 'lik konsantrasyonda yine en yüksek %89.9 ABTS + radikal süpürme aktivitesi gösterdiğini bildirerek antioksidan kaynağı olarak kullanılabileceğini öne sürmüşlerdir.

**Ayaz Tilkat ve ark. (2019)**, yaptıkları çalışmada, farklı tuz konsantrasyonlarının (0, 50, 100, 150, 200, 250 mM) *In vitro* koşullarda yetiştirilen *P. lentiscus* fidelerinin büyüme ve fizyolojik parametreleri üzerindeki etkisi araştırmışlardır. *In vitro* yetiştirilen sürgünlerin yüksek tuz konsantrasyonlarından etkilendiğini, kök ve gövde uzunluklarının, bağıl su içeriğinin (RWC), toplam klorofil, Cl-a, Cl-b ve karotenoid değerlerinin önemli ölçüde azaldığını, özellikle uygulanan en

yüksek tuz konsantrasyonuna ait gruplarda, kök ve gövde büyümesinin tamamen durduğunu ve 50 mM tuz konsantrasyonlarının üzerindeki uygulamalarda antioksidan bir enzim olan peroksidazın (POD) aktivitesinde de düşüş olduğunu tespit etmişlerdir.

**Ghajarbeygi ve ark. (2019)**, İran'da yetişen *P. khinjuk* ve *Allium sativum* yapraklarından elde ettikleri uçucu yağın kolinesteraz enzimlerinin aktivitesi üzerine yaptıkları araştırmada, *P. khinjuk*'a ait ekstrelerin AChE ve BChE'ye karşı sırasıyla %83.6 ve %81.4'lük bir inhibisyon gösterdiği, *A.sativum*'dan daha fazla fenolik içeriğe sahip olduğunu ve toplam fenolikler ile antikolinesteraz potansiyeli arasında anlamlı pozitif bir korelasyon gözlendiğini belirtmişlerdir. Yetişkin erkek Wistar sıçanlarına ağızdan uyguladıkları %3'lük konsantrasyondaki *P. khinjuk*'a ait uçucu yağın güçlü AChE ve BChE inhibitörleri olduğu sonucuna varmışlardır.

**Achili ve ark. (2020)**, *P. atlantica*'nın yaprak ve gövdesinden elde edilen farklı ekstraktların antioksidan, antiproliferatif ve antikolinesteraz aktivitelerini araştırdıkları çalışmalarında, serbest radikal süpürücü özellik (DPPH yöntemiyle) bakımından tüm ekstrelerin sentetik antioksidanlar olan BHT ve BHA'ya oranla daha güçlü inhibe edici aktivite gösterdiğini, HeLa hüresine karşı önemli derecede antiproliferatif aktivite gösterdiğini, ayrıca HPLC-TOF/MS analizi ile 22 fitokimyasal maddenin varlığının belirlediğini ve gallik asit ve rutin tespit edilen ana bileşikler olduğunu rapor etmişlerdir.

**Ayaz Tilkat ve ark. (2021)**, *P. khinjuk* *In vivo* erkek ve dişi genotipleri ile *In vitro* sürgün kültürlerinden elde edilen kök, gövde ve yaprak kısımlarından hazırlanan ekstrelerin karşılaştırmalı olarak sitotoksik, antihipertansif aktiviteleri ile kolinesteraz, üreaz, tirozinaz ve elastaz gibi enzim inhibisyonu aktiviteleri üzerine yaptıkları çalışmada, sitotoksik aktivite bakımından çalışılan tüm örneklerin MCF-7 ve HT-29 hücre serilerine karşı sitotoksik etki gösterdikleri, BChE enzim inhibisyonuna örneklerin aktif, ancak AChE enzim inhibisyonu göstermedikleri, *In vitro* örneklere ait hiçbir ekstrede antiüreaz aktivitesinin gözlenmediği ayrıca *In vivo* örneklerin, *In vitro* örneklere nazaran daha yüksek üreaz ve tirozinaz enzim inhibisyon aktivitesine sahip oldukları, antielastaz aktivite bakımından ise sadece *In vitro* yaprak ekstreleri dışındaki tüm ekstrelerin aktif sonuçlar verdiğini belirtmişlerdir.

**Rauofi ve ark. (2021)**, 5 farklı *P. vera* genotipini (Akbari 2, Ahmad-Aghaee, Italyayi, Badami ve Ghazvini) tuza en toleranslı genotipi bulmak amacıyla, sırasıyla 0, 60 ve 120 mM tuz konsantrasyonlarını içeren farklı MS besi ortamlarında *In vitro* koşullarda kültüre almışlardır. Artan tuzluluk seviyesinin, fıstık genotiplerinin gövde

uzamasını, yaprak sayısını, taze ağırlığını, nişasta, klorofil indeksini ve  $K^+$  içeriğini önemli ölçüde azalttığını, ancak çözünür şekerlerin içeriği, prolin, malondialdehit (MDA),  $Na^+$  ve  $Cl^-$ , artan tuzluluk seviyesini ise önemli ölçüde arttırdığını belirtmişlerdir. En yüksek tuzluluk seviyesi altında 'Akbari 2' nin diğer genotiplere oranla daha yüksek değerleri içermesi dolayısıyla en toleranslı tek çeşit olduğu sonucuna ulaşmışlardır.

### 3. MATERYAL VE YÖNTEM

#### 3.1. Bitkisel Materyal

Bu çalışmada bitkisel materyal olarak 2019 yılı, Temmuz-Eylül ayları arasında Gaziantep Fıstık Araştırma Enstitüsü'nden alınan antepfıstığı (*P. vera* L.) tohumları (Şekil 3.1) ile *In vivo* olarak yetişen erkek ve dişi antepfıstığı kök, gövde ve yaprakları kullanıldı. Doku kültürü çalışmaları Batman Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü Biyoteknoloji Laboratuvarı'nda, biyolojik aktivite çalışmaları ise, Dicle Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmakognozi Laboratuvarı'nda gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3.1. Antepfıstığı (*P. vera* L.) tohumları

#### 3.2. Yöntem

##### 3.2.1. *In vitro* kültürlerin hazırlanması

###### Sterilizasyon

Çalışma ortamı, besin ortamlarının, kullanılan alet ve ekipmanların ve bitki materyallerinin yüzey sterilizasyonu uygulamaları aşağıda ifade edildiği şekilde yapıldı;

Öncelikle kültür öncesinde kullanılacak stereril kabinin içi ve dışı %96'lık etil alkolle silindikten sonra kabin UV lambası 1 saat süresince açılarak kabinin steril olması sağlandı. Akabinde zemin, tezgâh, kapı ve raflar ise %70'lik etil alkolle silindi. Kullanılacak cam malzemeler (erlenmayer, cam şişe, mezür, balon joje, pipet vb.) 3'er kez saf sudan geçirilerek 180°C'ye ayarlanmış etüvde 3 saat boyunca steril edildi. Geriye kalan aletler (pens, bistüri, bistüri ucu vb.) ise, %96'lık etil alkol ile temizlendikten sonra steril kabin içerisinde bulunan boncuklu sterilizatörde (Steri 350 swiss made) 250°C'de 1 dk süresince bekletildi. İçerisine MS besiyeri konulacak olan Magenta GA-7 kültür kapları, 121°C'de, 1 atm. basınç altında, 25 dakika boyunca ve

distile sular ise, 3 saat boyunca otoklavda bekletilerek steril edildi. Sterilitenin kontrolü otoklav bandı kullanılarak kontrol edildi.

Tohum sterilizasyonu steril kabin içerisinde gerçekleştirildi. Tohumlar öncelikle ön sterilizasyon işlemine tabi tutularak %70'lik etil alkol içerisinde 45-50 sn çalkalandı. Akabinde %20 sodyum hipoklorit (NaOCl) çözeltisinde 20 dk. süresince bekletilerek üzerlerinde bulunması muhtemel olan mikroorganizmalardan arındırıldı. Uygulanan kimyasalların uzaklaştırılması için ise, 7 kez 5'er dk. boyunca steril distile suda çalkalanarak durulandı.

### **Besi ortamlarının hazırlanması**

Sterilize edilen tohumların çimlenmesinde modifiye edilmiş temel MS besi ortamı kullanıldı. Ortamların hazırlanması sırasında kullanılan makro ve mikro elementler, aminoasitler ve vitaminler önceden stok çözeltiler halinde hazırlandı. Çalışmalarda, tam güçlü (1/1) MS konsantrasyonunda hazırlanmış besi ortamları kullanıldı. Kullanılan tüm maddeler g/l, mg/l ve/veya (w/v) yüzde cinsinden ifade edildi. Besin ortamları hazırlanırken önceden oluşturulan bu stok çözeltilerden 1 litre için gerekli miktarlar alınarak behere aktarıldı, sonra gerekli bitki büyüme düzenleyici miktarları ilave edildi. Ortama 30 g sükröz eklenip, hacim distile su ile 1 litreye tamamlandı. 1 N HCl (hidrojen klorür) ve 1 N NaOH (sodyum hidroksit) ile çözeltinin pH'ı 5,8'e ayarlandı. Son olarak katılaşmayı sağlaması amacıyla çözeltilere 6.2 g/l agar eklendi ve kültür kaplarına yaklaşık 20'şer ml olacak şekilde döküldü. Ağızları kapatılan kültür kapları, otoklavda 121°C'de 15 dk. otoklava bırakılarak steril edildi. Çalışmada kullanılan besi ortamlarına ait stok çözeltiler ve 1 litre MS temel besi ortamının hazırlanması ile ilgili bilgiler **Çizelge 3.2** ve **Çizelge 3.3**'te verildi.

**Çizelge 3.2.** MS besi ortamının hazırlanmasında kullanılan solüsyonlar ve miktarları

<b>MS (Makro Elementler) Ana Solüsyonu</b>	
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	16.5g
KNO <sub>3</sub>	19.0 g
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	4.4 g
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	3.7 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.7 g
Distile Su	1000 ml'ye tamamlanır.
<b>MS (Mikro Elementler-1) Ana Solüsyonu</b>	
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	620 mg
MnSO <sub>4</sub> .4H <sub>2</sub> O	1695 mg
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	860 mg
KI	83 mg
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	35 mg
Distile Su	1000 ml'ye tamamlanır.

<b>MS (Mikro Elementler-2) Ana Solüsyonu</b>	
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	25 mg
CoCl <sub>2</sub> .6 H <sub>2</sub> O	25 mg
Distile Su	200 ml'ye tamamlanır.
<b>Komplex Kelatör Ana Solüsyonu</b>	
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	3,725 g
Na <sub>2</sub> EDTA	2,785 g
Distile su	1000 ml'ye tamamlanır.
<b>Vitamin Karışımı Ana Solüsyonu</b>	
Nikotinic asit	50 mg
Glisin	200 mg
Pridoksin HCl	50 mg
Distile su	100 ml'ye tamamlanır.
<b>B<sub>1</sub> Vitamini Ana Solüsyonu (10<sup>-3</sup>)</b>	
Tiamin HCl	10 mg
Distile Su	100 ml'ye tamamlanır.
<b>Myo-inositol (10<sup>-3</sup>)</b>	
myo-inositol	100 mg
Distile Su	1000 ml'ye tamamlanır.

**Çizelge 3.3.** Standart MS besi ortam içeriği\* (g/l)

MS ana solüsyonu (Makro elementler)	100 ml
MS mikroelementler-1	10 ml
MS mikroelementler-2	1 ml
Komplex kelatör	10 ml
Vitamin karışımı	1 ml
B <sub>1</sub> vitamini ana solüsyonu	1 ml
Sakkaroz	30 g
Agar	6.2 g
Distile su	1000 cc.'ye tamamlanır.

\* Tez çalışmasında Sigma Ltd. kimyasalları kullanılmıştır.

### **Sürgünlerin proliferasyonu**

Tohumların yüzey sterilizasyonu, *In vitro* şartlarda çimlendirilmesi ve elde edilen sürgünlerin proliferasyonu aşamalarında Tilkat ve ark., (2008) ile Onay (2000)'ün yapmış olduğu protokoller modifiye edilerek gerçekleştirildi. Buna göre, tohumların çimlendirilmesi için, tohumlar öncelikle ön sterilizasyon işlemine tabi tutulmuş ve %70'lik etil alkol içerisinde 45-50 sn çalkalandı. Daha sonra %20 sodyum hipoklorit (NaOCl) çözeltisi içerisinde 20 dk. bekletilerek olası mikrobiyal kontaminasyonlardan ve akabinde 7 kez 5'er dk olmak koşuluyla steril distile suda yıkanarak NaOCl bulaşığından arındırıldı. Çalkalama işlemlerinin tümü 150 rpm'de çalışan bir çalkalayıcı üzerinde, durulama ve sterilanttan arındırma işlemleri ise steril distile saf suda

çalkalama yoluyla yapıldı. Sterilizasyon işlemi tamamlanan tohumlar, 30 g/l sakkaroz, 6.2 g/l agar destekli ve herhangi bir bitki büyüme düzenleyicisi içermeyen MS besi ortamına bir kontrol grubu ile birlikte 50-150 ve 250 mM şeklinde 3 farklı oranda NaCl ilave edilen MS besi ortamlarına aktarılarak  $25\pm 2$  °C de 16/8 ışık/karanlık fotoperiyoda sahip kontrollü bir bitki büyütme odasında çimlendirildi.

*In vitro* şartlarda sürgün proliferasyonu yoluyla elde edilen kök, gövde ve yapraklar gölgede kurutularak ekstraksiyon işlemleri için hazırlandı. Tüm tablolarda ekstreler aşağıda verildiği gibi kodlandı.

E.Y.	: Doğal Erkek Yaprak
D.Y.	: Doğal Dişi Yaprak
E.G.	: Doğal Erkek Gövde
D.G.	: Doğal Dişi Gövde
E.K.	: Doğal Erkek Kök
D.K.	: Doğal Dişi Kök
I.K.Y.	: <i>In vitro</i> Kontrol Yaprak
I.K.G.	: <i>In vitro</i> Kontrol Gövde
I.K.K.	: <i>In vitro</i> Kontrol Kök
50 mM I.Y.	: 50 mM tuz uygulanmış <i>In vitro</i> Yaprak
50 mM I.G.	: 50 mM tuz uygulanmış <i>In vitro</i> Gövde
50 mM I.K.	: 50 mM tuz uygulanmış <i>In vitro</i> Kök
150 mM I.Y.	: 150 mM tuz uygulanmış <i>In vitro</i> Yaprak
150 mM I.G.	: 150 mM tuz uygulanmış <i>In vitro</i> Gövde
150 mM I.K.	: 150 mM tuz uygulanmış <i>In vitro</i> Kök
250 mM I.Y.	: 250 mM tuz uygulanmış <i>In vitro</i> Yaprak
250 mM I.G.	: 250 mM tuz uygulanmış <i>In vitro</i> Gövde
250 mM I.K.	: 250 mM tuz uygulanmış <i>In vitro</i> Kök

### 3.2.2. Biyolojik aktivite çalışmaları

#### Ekstrelerin hazırlanması

Eksplantlar (kök, gövde ve yapraklar) ayrı ayrı bir öğütücü yardımıyla toz haline getirildi ve tartıldı. Daha sonra kuru bitki örneklerinin üzerlerine etanol (50 mL, 3x24 s.) ilave edilerek çalkalayıcı ile 260 rpm'de ekstrakte edildi. Süzme ve çözücü uçurma işlemlerinden sonra ham ekstratlar elde edildi. Bu ekstratlar, etanolde çözülerek 4000 mM derişiminde 10'ar mL çözeltiler hazırlandı. Akabinde bu çözeltilerden ise, 1000 mg/l derişiminde 5'şer mL'lik çözeltiler hazırlandı (Bakır ve ark., 2020).

#### Antihipertansif aktivitenin belirlenmesi (Anjiyotensin I-dönüştürücü Enzim, ACE, İnhibisyonu)

Kwon ve ark. (2006) tarafından geliştirilen yöntem modifiye edilerek kullanıldı. Elli mikrolitre örnek çözeltileri, 2 mU ACE içeren 200 µL NaCl-borat tampon çözeltileri (0,3 M NaCl, pH 8,3) ile 25°C'de 10 dk inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında reaksiyon çözeltilerine 100 µL 5,0 mM substrat (hippüril-histidil-lösin) eklenmiş ve 37°C'de 1 saat inkübe edildi. Boş örnek (enzim ve substrat yerine tampon çözelti içeren), kontrol (ekstre örneği yerine saf su içeren) ve boş deneme (ekstre örneği ve enzim yerine tampon çözelti içeren) ile de analiz yapıldı. Reaksiyon 150 µL 0,5 N HCl eklenerek sonlandırılacak ve oluşan hippurik asidin tayini diyot dizili dedektörlü yüksek performanslı sıvı kromatografisi (LC-MS/MS) ile 228 nm dalga boyunda gerçekleştirildi (Ayaz Tilkat ve ark., 2021).

#### Antikolinesteraz aktivitenin belirlenmesi

AChE enziminin hazırlanması: 1,17 mg (498.3498 U) AChE enzimi alınarak 5 mL pH=8 tampon çözeltilerinde çözüldü ve 1'er mL'lik beş bölüme ayrıldı. Her biri için 99,66996 U/mL'lik konsantrasyon sağlanmış oldu ve 1 mL'lik stoklar da 125 µL'lik 8 eşit bölüme ayrıldı (0,09966996 U/µL). 125 µL'lik enzim çözeltilerine 460 µL pH=8 tampon çözeltisi eklendi (0,021297 U/µL) . 585 µL çözelti 25 µL'ik 23 tane küçük eppendorf tüplere doldurularak daha sonra kullanılmak üzere derin dondurucuda bekletildi. Stok çözeltiler kullanılmadan önce pH=8 tampon çözeltilisiyle 2150 µL'ye tamamlandı (2,476x10<sup>-4</sup> U/µL).

BChE enziminin hazırlanması: 1 mg (11,4 U) BChE enzimi alınarak 5 mL pH=8 tampon çözeltilerinde çözüldü (2,28 U/mL). Bu çözeltilerden 300 µL'lik stoklar oluşturulup küçük şişelere dolduruldu ve daha sonra kullanılmak üzere derin dondurucuda bekletildi (0,00228 U/µL). Stok çözeltiler kullanılmadan önce 1850 µL pH=8 tampon çözeltilerinden eklenerek kullanıma hazır hale getirilir (3,1813x10<sup>-4</sup> U/µL).

4000 µM standart Galantamin çözeltisinin hazırlanması: 2,3 mg galantamin 2 mL etanolde çözülerek galantamin çözeltisi hazırlanmış olur.

#### **Antikolinesteraz aktivite tayin yöntemi**

Asetilkolinin AChE tarafından tiyokoline parçalandıktan sonra, tiyokolinin sarı renkli 5-tiyo-2-nitrobenzoat anyonunu vermek üzere 5,5'-ditiyobis-(2-nitrobenzoik asit) (DTNB) ile reaksiyon verdiği kolorimetrik bir yöntem olan Ellman metodu, 96 kuyucuklu mikropalakalarda gerçekleştirildi (Ellman ve ark. 1961; Ertas ve Yener 2020).

#### **AChE aktivite testi**

Standart olarak galantamin kullanıldı. Mikroplaka ELISA okuyucuya yerleştirilerek 412 nm dalga boyunda absorbans okundu. AChE aktivitesi (%inhibisyon) aşağıdaki eşitlik kullanılarak hesaplandı.

$$\%İnhibisyon = (A_{\text{kontrol}} - A_{\text{örnek}}) / A_{\text{kontrol}} \times 100$$

Her bir örnekten üç paralel çalışma yapıldı.

#### **BChE aktivite testi**

AChE aktivite testinde uygulanan yöntem kullanıldı. Farklı olarak BChE inhibisyon aktivitesi için enzim olarak at serumundan elde edilen BChE enzimi, substrat olarak ise butiriltiyokolün iyodür kullanıldı. BChE aktivitesi (%inhibisyon) aşağıdaki eşitlik kullanılarak hesaplandı. Her bir örnekten üç paralel çalışma yapıldı.

$$\%İnhibisyon = (A_{\text{kontrol}} - A_{\text{örnek}}) / A_{\text{kontrol}} \times 100$$

#### **Antiürez ve antitirozinaz aktivitenin belirlenmesi**

Ürez enziminin hazırlanması: 1 mg (21 U) Ürez enzimi alınarak 1 mL pH=8,2 tampon çözeltisinde çözüldü ve 50 µL'lik 20 eşit bölüme ayrıldı ve daha sonra kullanılmak üzere derin dondurucuda bekletildi. Stok çözeltiler kullanılmadan önce pH=8,2 tampon çözeltisiyle 2000-3000 µL'ye tamamlandı.

Tirozinaz enziminin hazırlanması: 1 mg Tirozinaz enzimi alınarak 0,25 mL pH=6,8 tampon çözeltisinde çözüldü ve 50 µL'lik 5 eşit bölüme ayrıldı ve daha sonra kullanılmak üzere derin dondurucuda bekletildi. Stok çözeltiler kullanılmadan önce pH=6,8 tampon çözeltisiyle 2000-3000 µL'ye tamamlandı.

Tiyöüre standart çözeltisinin hazırlanması: 1 mg tiyöüre 1 mL etanolde çözülerek tiyöüre çözeltisi hazırlandı.

Kojik asit standart çözeltisinin hazırlanması: 1 mg kojik asit 1 mL etanolde çözülerek kojik asit çözeltisi hazırlandı.

### **Antiürezaz aktivitenin belirlenmesi**

Ürezaz inhibisyon aktivitesi için enzim olarak ürezaz enzimi, substrat olarak ise üre kullanılmaktadır (Hina ve ark., 2015; Akdeniz ve ark., 2021). Mikroplakadaki kuyucuklara önce etanol içinde 4000 ppm konsantrasyonda hazırlanan çözeltilerinden 10 µL ve enzim çözeltisinden 25 µL konuldu daha sonra 50 µL substrat (üre) ilave edildi. Mikroplaka ELISA okuyucuya yerleştirilerek 630 nm dalga boyunda ilk absorbans okundu. Bu çözelti 15 dakika süre ile 30°C de inkübe edildi. 15 dakika sonra bu çözeltinin üzerine 45 µL fenol reaktifi ve 70 µL alkali reaktif konuldu. 20 dk inkübasyondan sonra 630 nm dalga boyunda son okuma yapıldı ve absorbans okundu. Standart olarak tiyoüre kullanıldı. Ürezaz aktivitesi (%inhibisyon) aşağıdaki eşitlik kullanılarak hesaplandı.

$$\%İnhibisyon = (A_{\text{kontrol}} - A_{\text{örnek}}) / A_{\text{kontrol}} \times 100$$

### **Antitirozinaz aktivitenin belirlenmesi**

Tirozinaz inhibisyon aktivitesi için enzim olarak tirozinaz enzimi, substrat olarak ise L-DOPA kullanılmaktadır (Hearing ve ark. 1987; Akdeniz ve ark., 2021). Mikroplakadaki kuyucuklara 150 µL fosfat tamponu (pH =6,8), ekstrelerin etanol içinde 4000 ppm konsantrasyonda hazırlanan çözeltilerinden 10 µL ve enzim çözeltisinden 20 µL konuldu. Mikroplaka ELISA okuyucuya yerleştirilerek 3 dk karıştırıldı 475 nm dalga boyunda ilk absorbans okundu. Bu çözelti 10 dakika süre ile 37°C de inkübe edildi. 10 dakika sonra 20 µL substrat (L-DOPA) ilave edildi. Tekrar 10 dk 37°C'de inkübasyondan sonra 475 nm dalga boyunda son okuma yapıldı ve absorbans okundu. Tirozinaz aktivitesi (%inhibisyon) aşağıdaki eşitlik kullanılarak hesaplandı. Standart olarak kojik asit kullanıldı.

$$\%İnhibisyon = (A_{\text{kontrol}} - A_{\text{örnek}}) / A_{\text{kontrol}} \times 100$$

### **Antioksidan aktivitenin belirlenmesi**

#### **Örneklerin Toplam Fenolik ve Flavonoid İçeriklerinin Belirlenmesi**

Çalışılan ekstrelerin toplam flavonoid ve fenolik içerikleri, sırasıyla kersetin ve pirokatekol bileşiklerine eşdeğer olarak hesaplandı (Slinkard ve Singleton, 1977; Moreno ve ark., 2000; Ertas ve ark., 2021a).

Ekstrelerin toplam flavonoid ve fenolik içeriğini hesaplamak için aşağıdaki denklemler kullanıldı.

$$\text{Absorbans} = 0.0548x + 0.0333 \text{ Pirokatekol } (\mu\text{g}) \quad (r^2 = 0.9949)$$

$$\text{Absorbans} = 0.0398 x + 0.0039 \text{ Kersetin } (\mu\text{g}) \quad (r^2 = 0.9936)$$

### Örneklerin Antioksidan Aktiviteleri

Çalışılan bitki türlerinin toprak üstü kısımlarının etanol ekstratlarının antioksidan aktiviteleri DPPH serbest radikali giderim aktivitesi, ABTS katyon radikali giderim aktivitesi ve CUPRAC (Bakır (II) iyonu indirgeme antioksidan kapasitesi) yöntemleriyle belirlendi (Blois ve ark., 1958; Re ve ark., 1999; Apak ve ark., 2004; İzol ve ark., 2021; Ertas ve ark., 2021b). Tüm antioksidan aktivite yöntemlerinde standart olarak  $\alpha$ -TOC ve BHT kullanıldı.

DPPH serbest radikali giderim aktivitesi yönteminde 160  $\mu$ L 0.1 mM DPPH çözeltisi etanolde çözünmüş 40  $\mu$ L örnek çözeltisine konularak 30 dk sonra 517 nm dalga boyunda absorbans değerleri ölçüldü. ABTS katyon radikali giderim aktivitesi yönteminde ise suda hazırlanan 7 mM ABTS çözeltisine 2,45 mM potassium persulfate eklenerek oda sıcaklığında 12 saat bekletildi. Hazırlanan bu çözelti etanol ile seyreltilerek absorbansı 734 nm dalga boyunda 0,700 $\pm$ 0,025 olarak ayarlandı. Bu çözeltiden 160  $\mu$ L alınarak etanolde çözünmüş 40  $\mu$ L örnek çözeltisine konularak 30 dk sonra 734 nm dalga boyunda absorbans değerleri ölçüldü. DPPH serbest radikali giderim aktivitesi, ABTS katyon radikali giderim aktivitesi yöntemlerinde inhibisyon hesaplanmasında aşağıdaki denklem kullanıldı.

ABTS katyon radikal giderim aktivitesi ve DPPH serbest radikali giderim aktivitesi (%inhibisyon) aşağıdaki eşitlik kullanılarak hesaplandı. Her bir örnekten üç paralel çalışma yapıldı. Standart olarak  $\alpha$ -Tokoferol ve BHT kullanıldı.

$$\% \text{İnhibisyon} = (A_{\text{kontrol}} - A_{\text{örnek}}) / A_{\text{kontrol}} \times 100$$

CUPRAC yönteminde, örneklerdeki antioksidan bileşikler varlığında Cu(II)-Neokuproin (Nc) kompleksi, renkli Cu(I)-Nc kelatına indirgenir ve bu kelatın 450 nm'de absorbansı ölçülür. Hazırlanan örnekler ve standartların üzerine, son konsantrasyonları 10, 25, 50, 100  $\mu$ g/mL olacak şekilde Cu (II), neokuproin ve NH<sub>4</sub>OCH<sub>3</sub>COO tamponu ilave edildi ve 1 saat sonra 450 nm'de absorbans ölçüldü. Örneklerin absorbans değerleri standartlara karşı değerlendirildi. Her bir örnekten üç paralel çalışma yapıldı. Standart olarak BHT ve  $\alpha$ -TOC kullanıldı.

### 3.2.3. İstatistiksel analiz

Tüm istatistiksel hesaplamalar Minitab 16.2.1. istatistiksel yazılım (MINITAB Inc, 2010) kullanılarak yapıldı. Çalışmada *P. vera* türünün kimyasal içeriklerinin sonuçları çoklu değişken analizi, temel bileşen analizi (PCA) ve hiyerarşik kümeleme analizi (HCA) teknikleri kullanılarak yapıldı.

## 4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA

### 4.1. *In vitro* Çalışmalara Ait Sonuçlar ve Tartışma

Doğal şartlarda yetişen olgun *P. vera*'nın erkek ve dişi ağaçlarından alınan kök, gövde ve yaprak kısımlarının biyolojik aktiviteleri ile, tohumdan itibaren *In vitro* şartlarda bir kontrol grubu ile birlikte farklı tuz konsantasyonları uygulanmış ve tuz içermeyen MS besi ortamında çimlendirilen fidelere ait kök, gövde ve yaprak kısımlarının biyolojik aktivitelerinin karşılaştırmalı olarak değerlendirmeye alındığı bu tez kapsamında, *In vitro* kültürlerin başlatılması için Tilkat ve ark., (2008) ile Onay (2000)'in geliştirmiş oldukları *In vitro* mikroçoğaltım protokolleri kullanılmış ve *In vitro* kültürlerden başarılı bir şekilde fidelikler elde edilmiştir. **Şekil 4.1. (A)**'da *In vitro* şartlarda çimlenmeye bırakılan tohumlar, **Şekil 4.1. (B)**'de 28 günlük kültür periyodu sonucunda BBD içermeyen MS besi ortamında çimlendirilmiş fideler **Şekil 4.1. (C)**'de ise 28 günlük kültür periyodu sonucunda BBD içermeyen ve 250 mM tuz elisitasyonundan elde edilen fideler verilmiştir.



**Şekil 4.1.** (A) *In vitro* çimlenmeye bırakılan *P. vera* L. tohumları (B) BBD içermeyen MS besi ortamında çimlendirilmiş fideler (C)'de ise 28 günlük kültür periyodu sonucunda BBD içermeyen ve 250 mM tuz elisitasyonundan elde edilen fideler. (Barlar; A ve C: 0.9 cm-B:1.1 cm)

Sahip olduğu ekonomik ve tıbbi değeri nedeniyle yeşil altın ağaç olarak bilinen antepfıstığı ağacı, Türkiye' de eski zamanlardan beri yetiştirilmektedir. Bitkinin vejetatif olarak üretilmesindeki zorluklar nedeniyle, antepfıstığı bitkisi üretiminin iyileştirilmesinde bitki doku kültürü yöntemlerinin kullanımı önem kazanmıştır (Özden Tokatlı, 2005). Bu tez kapsamında nihai amaç Antepfıstığının tohumdan itibaren yeni bir mikroçoğaltım protokolü olmadığından kontrol gruplarının oluşturulmasında ve elisitasyon denemeleri için antepfıstığı tohumlarının başarılı bir şekilde *In vitro* çimlendirilmesi çalışmalarında Tilkat ve ark., (2008) ve Onay (2000) tarafından daha önce denenmiş ve başarılı sonuçların elde edildiği kültür teknikleri uygulanmıştır.

## 4.2. Biyolojik Aktivite Çalışmalarına Ait Sonuçlar ve Tartışma

### 4.2.1. Antihipertansif aktivite sonuçları ve tartışma

*P. vera*'ya ait *In vivo* dişi ve erkek genotipler ile *In vitro* örneklere ait ekstrelerin antihipertansif aktiviteleri **Çizelge 4.1.**'de sunulmuştur.

**Çizelge 4.1.** irdelendiğinde, antihipertansif aktivite bakımından maksimum sonuçların *In vivo* dişi yaprak ekstrelerinden elde edildiği (77,7) tespit edilmiştir. *In vivo* kökenli ekstreleri kendi içinde değerlendirdiğimizde, ikinci sırada *In vivo* erkek gövde ekstrelerinin yer aldığı, *In vivo* dişi gövde ve erkek kök kısımlarının aktivite göstermediği ve *In vivo* dişi kök kısımlarının ise minimum (15,0) değere sahip olduğu görülmüştür. *In vitro* uygulamaları kendi içinde değerlendirdiğimizde ise, maksimum sonucun 250 mM tuz uygulanmış kök ekstrelerine ait olduğu, yine bu sıralamayı 43,4 ile 150 mM tuz uygulanmış gövde ekstrelerinin takip ettiği belirlenmiştir. Genel anlamda antihipertansif aktivite bakımından *In vivo* kökenli ekstrelerin *In vitro* kökenli ekstrelerle kıyasla daha yüksek değerlere sahip olduğu söylenebilir.

**Çizelge 4.1.** *P. vera* L'ya ait *In vivo* ve *In vitro* örneklerin antihipertansif aktivite sonuçları

Örnekler	ACE <sup>a</sup>
<b>E.Y.</b>	22,0
<b>D.Y.</b>	<b>77,7</b>
<b>E.G.</b>	45,1
<b>D.G.</b>	A.D
<b>E.K.</b>	A.D
<b>D.K.</b>	15,0
<b>I.K.Y.</b>	20,4
<b>I.K.G.</b>	A.D
<b>I.K.K.</b>	<b>32,6</b>
<b>50 mM I.Y.</b>	8,2
<b>50 mM I.G.</b>	9,3
<b>50 mM I.K.</b>	A.D
<b>150 mM I.Y.</b>	37,7
<b>150 mM I.G.</b>	43,4
<b>150 mM I.K.</b>	A.D
<b>250 mM I.Y.</b>	11,7
<b>250 mM I.G.</b>	13,4
<b>250 mM I.K.</b>	<b>47,1</b>
<b>Lisinopril<sup>b</sup></b>	<b>89,1</b>

a: Değerler 3 paralel ölçümün ortalaması ve standart sapması olarak verilmiştir (100 µg/ml). b: Standart madde, A.D: Aktif değil

Hipertansiyon kritik bir sağlık sorunudur ve verdiği zararlar bakımından diğer kardiyovasküler hastalıklardan daha önde yer alır. Bitkisel ilaçlar, minimum yan etki ile hipertansiyonun yönetimi ve tedavisi için milyonlarca yıldır kullanılmaktadır (Verma ve ark., 2020). *Digitalis purpurea* (yüksük otu) gibi bitki türlerinden digitoksin

türetilmiştir. Benzer şekilde *Rauwolfia serpentina* türlerinden reserpin, *Salix alba* (söğüt kabuğu)'dan aspirin, *Jatropha podagrica*'dan tetrametilpirazin ve *Stephenia tetradra*'dan tetrandrine türetilmiştir. Bu bitki kaynaklı antihipertansif ajanlar farklı mekanizmalar yoluyla bilimsel olarak kanıtlanmıştır (Sultana ve Asif., 2017). Son 20 yılda, tıbbi bitkiler, yeni bileşiklerin keşfedilme kaynakları olarak önemini korudu. Güvenli, etkili ve uygun maliyetli antihipertansif ilaçların geliştirilmesinde kullanıldılar (Amira ve Okubadejo, 2007). Bitki kaynaklı sekonder metabolitler terapötik değere sahiptir ve geleneksel olarak tıbbi amaçlar için kullanılır (Assob ve ark., 2011). Birçok flavonol, ACE inhibitör özelliğine sahiptir. *Sedum sarmentosum* geleneksel olarak tıbbi bir bitkidir ve ACE inhibitör aktiviteye sahip olduğu tespit edilen beş flavonolün kaynağıdır (Oh ve ark., 2004). Ahmed ve Urooj, (2010)'nın *Ficus racemosa* gövde kabuğunda yaptıkları bir çalışmada *In vitro* olarak doza bağlı bir ACE inhibisyonu özelliği gösterdiği bildirilmiştir. Randomize, çift kör, plasebo kontrollü bir çalışmada, 28 gün boyunca 730 mg/d'lik diyet kersetin takviyesinin, hipertansif hastalarda kan basıncını düşürmede etkili olduğu bulunmuştur (Edwards ve ark., 2007). Flavonoid bakımından zengin elma kabuğu özütünün çalışıldığı çalışmada ise, genistein hariç test edilen tüm flavonoidler ve iki kuersetin metabolitinin (kersetin-3-O-glukuronik asit ve kuersetin-3-O-sülfat) ACE'yi önemli ölçüde inhibe ettiği bildirilmiştir (Balasuriya ve Vasantha Rupasinghe, 2011). *P. atlantica* yapraklarının materyal olarak kullanıldığı bir başka çalışmada, ACE-I aktivitesini inhibe edebilecek fenolik bileşikleri içerdiğini sonuç olarak bu bitkinin yapraklarının antihipertansif aktivitenin geliştirilmesi için bir potansiyel olduğunu rapor etmişlerdir. Ayaz Tilkat ve ark., (2021) tarafından, *P. khinjuk* *In vivo* erkek ve dişi genotipleri ile *In vitro* sürgün kültürlerinden elde edilen kök, gövde ve yaprak kısımlarından karşılaştırmalı olarak antihipertansif aktivitelerini araştırdıkları bir diğer çalışmada ise, kullanılan standarda en yüksek aktivitenin *In vivo* dişi genotiplere ait kök ekstrelerinden elde edildiği ve *In vitro* ekstreler içerisinde sadece gövde kısımlarında yine yüksek seviyede aktivite görüldüğünü bildirmişlerdir.

Çalışmamızda ise, *In vivo* kökenli dişi yaprak ekstrelerinin Lisinopril'den sonra en yüksek aktiviteyi verdiği, bunun yanında 150 mM tuz elisitasyonunun ise kontrol yaprak ekstrelerine oranla antihipertansif aktiviteyi arttırdığı yine kontrol gövde ekstrelerinde aktivite gözlenmezken 50, 150 ve 250 mM tuz elisitasyonunun gövde ekstrelerinde, 250 mM tuz elisitasyonunun da kök ekstrelerinde aktiviteyi tetikleyerek belirgin bir artışa yol açtığı belirlenmiştir. Dolayısıyla, yukarıda verilen literatürler göz önüne alındığında antihipertansif aktivite bakımından cins düzeyinde farklı kısımların

rol oynadığı ancak genel anlamda *In vivo* ekstraların daha yararlı olduğu ve bu anlamda bir potansiyel teşkil ettiği söylenebilir.

#### 4.2.2. Enzim inhibisyonu aktivitelerine ait sonuçlar ve tartışma

##### Antikolinesteraz aktivite sonuçları ve tartışma

*P. vera*'ya ait *In vivo* dişi ve erkek genotipler ile *In vitro* örneklere ait antikolinesteraz aktiviteleri Çizelge 4.2.'te sunulmuştur.

Çizelge 4.2. irdelendiğinde, genel olarak *In vivo* ekstraların *In vitro* kontrol ve elisitasyon sonuçlarına oranla daha yüksek AChE ve BChE enzim inhibisyonuna sahip oldukları görülmüştür. Antikolinesteraz aktivite bakımından erkek genotiplere ait kök kısımlarının sırasıyla AChE enzim inhibisyonuna  $28,12 \pm 0,34$  ile ve BChE enzim inhibisyonuna ise  $69,61 \pm 1,20$  değerleri ile en yüksek aktiviteyi gösterdikleri belirlenmiştir. Ayrıca *In vivo* kökenli ekstraların BChE enzim inhibisyonuna karşı daha iyi sonuçlara sahip olduğu ve standart olarak kullanılan Galantamin'e ( $79,22 \pm 1,82$ ) yakın değerleri taşıdığı da tespit edilmiştir. *In vitro* kontrol ve elisitasyon sonuçlarına bakıldığında ise genel anlamda AChE enzim inhibisyonuna karşı bir aktiviteye sahip olmadıkları ancak yaprak ekstralarının diğer kısımlara oranla BChE enzim inhibisyonuna karşı daha etkili oldukları söylenebilmektedir.

Çizelge 4.2. *P. vera* L'ya ait *In vivo* ve *In vitro* örneklerin antikolinesteraz aktivite sonuçları

Örnekler	AChE <sup>a</sup>	BChE <sup>a</sup>
E.Y.	A.D.	62,94±1,29
D.Y.	A.D.	50,75±1,20
E.G.	1,16±0,01	37,86±2,17
D.G.	A.D.	25,75±1,10
E.K.	<b>28,12±0,34</b>	<b>69,61±1,20</b>
D.K.	12,71±0,12	61,33±0,51
I.K.Y.	<b>9,07±0,07</b>	<b>54,15±1,46</b>
I.K.G.	A.D.	41,78±1,13
I.K.K.	A.D.	34,47±1,25
50 mM I.Y.	<b>10,51±0,13</b>	<b>52,36±1,25</b>
50 mM I.G.	A.D.	50,24±0,59
50 mM I.K.	A.D.	32,35±0,62
150 mM I.Y.	A.D.	44,79±1,69
150 mM I.G.	A.D.	33,63±1,02
150 mM I.K.	A.D.	20,10±1,13
250 mM I.Y.	A.D.	38,06±1,71
250 mM I.G.	6,63±0,03	25,23±0,43
250 mM I.K.	A.D.	17,92±0,83
Galantamin <sup>b</sup>	<b>86,22±1,93</b>	<b>79,22±1,82</b>

a: Değerler 3 paralel ölçümün ortalaması ve standart sapması olarak verilmiştir (100 µg/mL).

b: Standart madde, A.D.: Aktif değil

Yaygın bir nörodejeneratif hastalık olan AH, nörotransmitter olan ACh'in beyindeki düşük seviyeleri ile karakterizedir. Nörodejeneratif hastalık, başta merkezi sinir sistemi olmak üzere nöronların kronik olarak bozulması ve bozulmasından kaynaklanan çeşitli durumlara uygulanan bir terimdir (Houghton ve Howes, 2005). Günümüzde hastalığın semptomatik tedavisinde en sık uygulanan strateji ise kolinesteraz enzim inhibitörlerinin kullanılmasıdır. Bu bağlamda birkaç tıbbi bitki ekstresinin AChE ve BChE inhibe edici aktivite gösterdiği rapor edilmiştir. Adsersen ve ark., (2006)'nın yapmış oldukları bir araştırmada *Ruta graveolens*, *Lavandula angustifolia*, *Rosmarinus officinalis*, *Petroselinum crispum* ve *Mentha spicata* ekstrelerinin orta düzeyde AChE inhibisyonunu sergilediğini rapor etmişlerdir. Portekiz'de yetişen on bitki türünden *Melissa officinalis* ve *Mentha suaveolens* uçucu yağ fraksiyonunda %50'den fazla AChE inhibe etme kapasitesi gösterdiği, *Laurus nobilis*, *Hypericum undulatum* ve *Sanguisorba minor* etanol özütülerinin, sırasıyla %64 (1 mg/ml), %68 (0,5 mg/ml) ve %78 (1 mg/ml) AChE inhibisyonu sergilediğini bildirmişlerdir (Ferreira ve ark. 2006). Orhan ve ark. (2007), 14 *Salvia* türünün petrol eter, kloroform, etil asetat ve metanol ekstrelerinin olası BChE inhibitör aktivitesini araştırdıkları çalışmalarında, *Salvia frigida* ve *Salvia migrostegea*'nın 1 mg/ml etil asetat, *Salvia candidissima* ssp. *occidentalis* ve *Salvia ceratophylla*'nın kloroform ve ayrıca *Salvia cyanescens*'in petrol eteri ekstrelerinin, BChE'yi %90'dan fazla inhibe ettiğini rapor etmişlerdir. *P. khinjuk*'a ait ekstrelerin AChE ve BChE'ye karşı sırasıyla %83.6 ve %81.4'lük bir inhibisyon gösterdiği (Ghajarbeygi ve ark., 2019), yine Türkiye'de yetişen *P. khinjuk* üzerine yapılan, *In vivo* erkek ve dişi genotipleri ile *In vitro* sürgün kültürlerinden elde edilen kök, gövde ve yaprak kısımlarından hazırlanan ekstrelerin karşılaştırmalı olarak verildiği başka bir çalışmada, hiçbir ekstrenin AChE enzim inhibisyonu göstermediğini, ancak %75 oranında BChE enzim inhibisyonuna sahip olduklarını rapor etmişlerdir (Ayaz Tilkat ve ark., 2021). *P. atlantica* subsp. *atlantica* yapraklarının kullanıldığı bir diğer çalışmada ise AChE'in iyi derecede inhibe edici aktiviteye sahip olduğunu belirtmişlerdir (Benamar ve ark., 2018). Çalışmamızda ise, *In vivo* erkek kök kısımlarının hem AChE hem de BChE enzim inhibisyon aktivitesi bakımından daha yararlı kısımlar olduğu, *In vivo* erkek ve dişi yaprak kısımlarında AChE enzim inhibisyonuna yanıt oluşturmadığı ancak *In vitro* ve 50 mM tuz elisitasyonunun bu kısımlarda aktivasyonu tetiklediği ve genel anlamda tüm ekstrelerin BChE enzim inhibisyon aktivitesine sahip olduğu tespit edilmiştir. Dolayısıyla hem *In*

*vivo* hem de *In vitro* elde edilen kök gövde ve yaprak kısımlarının BChE enzim inhibisyonuna sahip olduklarından tedavi amaçlı kullanılabileceği öne sürülebilir.

### Antiürez ve antitirozinaz aktivite sonuçları ve tartışma

*P. vera*'ya ait *In vivo* dişi ve erkek genotipler ile *In vitro* örneklere ait ekstrelerin ürez ve tirozinaz enzim inhibisyonuna ilişkin sonuçlar Çizelge 4.3.'te sunulmuştur.

Çizelge 4.3. irdelendiğinde, *In vivo* genotiplere ait erkek kök ekstrelerinin hem antiürez (61,98±1,71) hem de antitirozinaz (35,28±0,27) aktivite bakımından standart olarak kullanılan tiyoüre ve kojik asite tüm ekstreler içinde en yakın sonuçları içerdiği tespit edilmiştir. *In vivo* erkek genotiplere ait çalışılan tüm kısımların her iki enzim inhibisyonunda aktif olduğu görülmüştür. *In vitro* kontrol gruplarında, yaprak ekstrelerinin diğer ekstrelere oranla daha yüksek aktivite gösterdikleri bulunmuştur. Elisite edilen edilen ekstrelere bakıldığında ise, 50 (yaprak) ve 250 mM (göde ve kök) tuz elisitasyonuna bırakılan ekstrelerin her iki enzim inhibisyonu bakımından daha yararılı değerlere sahip oldukları görülmüştür.

Çizelge 4.3. *P. vera* L'ya ait *In vivo* ve *In vitro* örneklerin ürez ve tirozinaz enzim inhibisyonu sonuçları

Örnekler	Ürez <sup>a</sup>	Tirozinaz <sup>a</sup>
E.Y.	47,48±1,54	20,98±0,96
D.Y.	24,97±1,41	10,21±0,75
E.G.	12,46±0,34	18,66±0,23
D.G.	AD	AD
E.K.	<b>61,98±1,71</b>	<b>35,28±0,27</b>
D.K.	35,85±0,53	21,41±0,84
I.K.Y.	<b>38,72±1,06</b>	<b>9,39±0,18</b>
I.K.G.	AD	AD
I.K.K.	AD	7,89±0,08
50 mM I.Y.	<b>19,72±0,95</b>	3,16±0,05
50 mM I.G.	AD	<b>3,35±0,02</b>
50 mM I.K.	AD	AD
150 mM I.Y.	AD	AD
150 mM I.G.	AD	AD
150 mM I.K.	AD	AD
250 mM I.Y.	AD	AD
250 mM I.G.	14,96±0,16	3,20±0,03
250 mM I.K.	2,21±0,02	1,80±0,01
Tiyoüre <sup>b</sup>	<b>97,80±1,63</b>	
Kojik asit <sup>b</sup>	-	<b>89,23±1,21</b>

a: Değerler 3 paralel ölçümün ortalaması ve standart sapması olarak verilmiştir (100 µg/mL).

b: Standart madde, A.D.: Aktif değil

Ürez, *Helicobacter pylori* ve *Proteus mirabilis* için ve ayrıca belirli azotlu bileşiklerin çevresel dönüşümlerinde önemli bir virülans faktörüdür. Bu mikroorganizmaların neden olduğu üre hidrolizi, artan pH ve amonyak toksisitesine yol

açar ve insan mide mukozasının bakteriyel kolonizasyonunu ve idrar yollarında truvit ve karbonat-apatit taşlarının oluşumunu sağlar. Tıbbi uygulama olasılığı nedeniyle, insan sağlığı için düşük toksisite gereksinimini karşılayan ve düşük çevresel etkiye sahip yeni, seçici ve verimli üreaz inhibitörleri sınıflarının geliştirilmesi gereklidir (Macegoniuk, 2013). *Daphne retusa* (daphnretusic asit), *P. atlantica* (transilitin ve dihidro luteolin) ve pamuk (gossypol, gossypolone andapogossypol) bitkileri, fasulyeden elde edilen üreazın mikromolar inhibitörleri olarak görülmüştür (Mansoor ve ark., 2014; Uddin ve ark., 2015; Chen ve ark.,2015).

Üreaza karşı yakın zamanda belirlenmiş inhibitör etkiye sahip doğal ürünlerin temsili örnekleri olarak Afrika'da yetişen ve tıbbi bir bitki olan *Boswellia carterii*'nin bir kimyasal bileşeni olan boswellik asit, Çin'de gastrointestinal hastalıkların tedavisi için geleneksel olarak kullanılan bir bitki olan *Coptis chinensis*'ten palmatin ve epiberberin, yine Çin'de yetişen ve tıbbi bir bitki olan *Andro-graphis aniculata*'nın, andro-grapholide, ve ana diterpenoid lakton rapor edilmiştir (Kafarski ve Talma, 2018). *P. khinjuk*'a ait *In vivo* dişi ve erkek genotipler ile *In vitro* örneklerle ait ekstrelerinin antiüreaz ve antitirozinaz aktivitelerinin araştırıldığı bir çalışmada *In vitro* örneklerle ait hiç bir ekstrede antiüreaz aktivitesi gözlenmediği, *In vivo* dişi genotiplere ait kök ekstrelerinin 54,81±1,09 ile en yüksek antitirozinaz aktivite sergilediği, genel anlamda kök ekstrelerinin gövde ve yaprak kısımlarından daha iyi sonuçlar verdiği tespit edilmiştir (Ayaz Tilkat ve ark., 2021). *Rhus coriaria* (Sumak)'nın metanol ekstrelerinin de fasülye üreaz enzimi üzerine yüksek derecede antiüreaz aktivitesine sahip olduğu bildirilmiştir (Mahernia ve ark., 2015). Çalışmamızda ise, maksimum antiüreaz aktivitesine sırasıyla *In vivo* kökenli erkek kök, *In vitro* kökenli yaprak ve 50 mM tuz elisitasyonu yaprak ekstrelerinde rastlandığı ve bu kısımların ticari anlamda bir potansiyel teşkil edebileceği belirlenmiştir.

Melanin, saç ve ciltte bulunan ve insan cildini radyasyona karşı korumak için gerekli bir pigmenttir. Epidermal tabakada birikimi, melanogeneze veya cilt pigmentasyonuna yol açar (Villareal ve ark., 2017). Farmakolojik olarak, melanogenez, tirozinaz veya diğer ilgili melanojenik enzimlerin aktivitesini inhibe ederek kontrol edilebilir. Melanojenik enzimler arasında tirozinaz, melanin üretimini kontrol eden hız sınırlayıcı enzimdir (Lin ve ark., 2017). Melanogenez inhibisyonu için stratejik bir yöntem tirozinaz inhibitörlerinin kullanımınıdır. Bitkiler, bakteriler ve mantarlar dahil olmak üzere doğal kaynaklar, son zamanlarda biyoaktif bileşikler üreterek antitirozinaz

aktiviteleri için artan bir ilgi haline gelmiştir. Bazı araştırmacılar, özellikle gıda, kozmetik ve tıbbi uygulamalar için daha az toksisite ve daha iyi biyoyararlanımları nedeniyle doğal kaynaklardan gelen inhibitörleri tanımlamayı tercih etmektedir. Fenolik bileşiklerin bitkilerde bulunan en büyük fitokimyasal grubu olduğu ve esas olarak bitki ekstraktlarındaki aktivitelerden sorumlu faktörlerden biri olduğu iyi bilinmektedir. Birçok bitki ekstraktının tirozinaz inhibitör aktivitesi, yeni anti-tirozinaz bileşiklerini kaynakları bulmak için gerçekleştirilmiştir.

Çeşitli araştırmacılar tarafından *Asphodelus microcarpus* (Lee ve ark., 2017), *Limonium tetragonum* (Alam ve ark., 2012), *Arctostaphylos uva-ursi* (Kim ve ark., 2017), *Pleurotus ferulae* (Taherkhani, 2017) gibi bitkilerin antitirozinaz aktiviteleri rapor edilmiştir. *P. atlantica* subsp. *mutica*'nın metanol, n-hekzan, diklorometan, n-butanol, etil asetat ve sulu ekstraktlarının B16F10 melanom hücre hattında melanin sentezi ve oksidatif stres üzerine etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada 0.2-200 µg/mL metanol, etil asetat, ve n-butanol, 0.2 µg/mL n-hekzan, ve 20-200 µg/mL diklorometan konsantrasyonlarındaki ekstraktların, mantar tirozinaz aktivitesini inhibe ettiği bildirilmiştir (Eghbali-Feriz ve ark., 2018). *P. atlantica* subsp. *kurdica* ekstraktlarının pozitif kontrol olarak kojik asidin kullanıldığı bir diğer çalışmada ise, tirozinaz aktivitesi, melanin içeriği ve ROS üretimi üzerinde önemli azaltıcı etkilere sahip olduğu gözlemlenmiştir (Rahman, 2018). 18 farklı ekstrenin denendiği çalışma bulgularımızda, yarıdan fazla ekstrenin antitirozinaz aktivite gösterdiği tespit edilmiş maksimum sonucun *In vivo* kökenli erkek kök ekstraktlarına ait olduğu ve bu kısımların kozmetik endüstrisinde cilt pigmentini ve yaşlanmayı azaltmada yeni bir farmasötik ajan olarak değerlendirilebileceği düşünülmüştür.

#### **4.2.3. Toplam fenolik-flavonoid içeriği ve antioksidan aktivitelerine ait sonuçlar ve tartışma**

*P. vera*'ya ait *In vivo* dişi ve erkek genotipler ile *In vitro* örneklerine ait ekstraktların toplam fenolik-flavonoid içeriği ve antioksidan aktivitelerine ilişkin sonuçlar **Çizelge 4.4.**'te sunulmuştur. Pozitif kontrol olarak BHT ve  $\alpha$ -TOC kullanılmıştır.

**Çizelge 4.4.** irdelendiğinde, toplam fenolik- flavonoid içerik bakımından *In vivo* kökenli dişi kök ekstraktlarının maksimum toplam fenolik içeriğe (316,79±4,26), ve *In vivo* kökenli erkek kök ekstraktlarının ise, maksimum toplam flavonoid içeriğe (44,37±1,55) sahip olduğu görülmüştür. Toplam fenolik içeriğinin *In vivo* örneklerin daha çok kök, *In vitro* örneklerin ise yaprak kısımlarında, toplam flavonoid içeriğinin

ise *In vivo* örneklerin daha çok kök ve yaprak, *In vitro* örneklerin ise, yaprak kısımlarında biriktiği görülmüştür. 50 mM tuz elisitasyonunun, kontrol grubuna oranla gövdede toplam fenolik yapraklarda ise toplam flavonoid içeriğini arttırdığı saptanmıştır.

Antioksidan aktivite IC<sub>50</sub> adı verilen ve ekstraktın DPPH radikalinin yarısını süpürebildiği konsantrasyon üzerinden değerlendirildiği için, IC<sub>50</sub> değerinin düşük olması antioksidan kapasitenin daha güçlü olduğunu göstermektedir. Dolayısıyla *In vivo* kökenli erkek yaprak kısımlarından elde edilen ekstraktların ABTS ve CUPRAC sonucunda her iki standart sonucundan bariz bir şekilde düşük olduğu, *In vitro* kontrol grupları açısından yaprak ekstraktlarının de sonuç itibarıyla standart değerlerinden daha düşük seviyede seyrettiği ve elisite edilen ekstraktların ise uygulanan elisite dozunun, elisite edilen kısma ve standart çeşidine bağlı olarak değişiklik gösterdiği tespit edilmiştir.

**Çizelge 4.4.** *P. vera* L'ya ait *In vivo* ve *In vitro* örneklerin toplam fenolik - flavonoid ve antioksidan aktivite sonuçları

Örnekler	Toplam fenolik içeriği ( $\mu\text{g PEs/mg}$ ) <sup>b</sup>	Toplam flavonoid içeriği ( $\mu\text{g QEs/mg}$ ) <sup>c</sup>	Antioksidan Aktivite ( $\mu\text{g/mL}$ )		
			DPPH <sup>a</sup> (IC <sub>50</sub> )	ABTS <sup>a</sup> (IC <sub>50</sub> )	CUPRAC <sup>a</sup> (A <sub>0.5</sub> )
<b>E.Y.</b>	174,45±1,65	41,11±1,38	7,54±0,12	<b>2,35±0,02</b>	<b>4,02±0,02</b>
<b>D.Y.</b>	124,73±2,41	38,09±1,73	9,56±0,13	3,79±0,01	7,23±0,06
<b>E.G.</b>	148,45±2,90	34,95±1,42	25,12±0,87	9,87±0,12	9,34±0,11
<b>D.G.</b>	84,58±1,87	17,24±1,24	29,40±0,34	11,60±0,13	20,12±0,17
<b>E.K.</b>	308,73±3,08	<b>44,37±1,55</b>	<b>3,58±0,01</b>	6,35±0,06	4,31±0,02
<b>D.K.</b>	<b>316,79±4,26</b>	32,47±0,24	8,06±0,03	3,13±0,01	5,54±0,03
<b>I.K.Y.</b>	<b>214,14±3,61</b>	<b>36,08±1,80</b>	<b>10,86±0,09</b>	<b>8,46±0,11</b>	<b>8,33±0,07</b>
<b>I.K.G.</b>	81,54±2,08	24,40±1,26	26,14±0,85	20,12±0,21	12,53±0,13
<b>I.K.K.</b>	88,23±1,98	24,31±1,76	24,27±0,87	16,67±0,13	12,45±0,12
<b>50 mM I.Y.</b>	<b>123,81±3,58</b>	<b>40,39±2,52</b>	<b>23,34±0,49</b>	13,17±0,16	11,36±0,11
<b>50 mM I.G.</b>	106,48±3,61	20,00±1,24	25,29±0,69	20,83±0,23	11,98±0,09
<b>50 mM I.K.</b>	53,25±2,11	14,77±0,29	42,38±1,04	35,19±0,29	24,67±0,26
<b>150 mM I.Y.</b>	83,97±1,53	24,52±0,18	35,24±1,01	17,86±0,18	14,34±0,21
<b>150 mM I.G.</b>	75,76±1,90	18,37±1,01	33,76±0,96	28,43±0,16	11,90±0,09
<b>150 mM I.K.</b>	73,94±2,59	18,12±1,40	30,54±1,05	16,13±0,19	15,63±0,16
<b>250 mM I.Y.</b>	117,43±3,16	23,14±1,10	26,43±0,38	<b>13,16±0,21</b>	<b>7,13±0,04</b>
<b>250 mM I.G.</b>	57,51±1,05	17,19±0,52	49,49±1,18	23,34±0,27	14,27±0,15
<b>250 mM I.K.</b>	45,65±2,79	18,12±1,27	90,35±1,87	28,48±0,31	23,45±0,23
<b>BHT<sup>d</sup></b>	-	-	<b>52,92±1,43</b>	<b>14,67±0,73</b>	<b>9,24±0,19</b>
<b><math>\alpha</math>-TOC<sup>d</sup></b>	-	-	<b>14,93±0,54</b>	<b>8,98±0,14</b>	<b>16,17±0,37</b>

a: Sonuçlar IC<sub>50</sub> değerleri olarak verilmiştir ve değerler 3 paralel ölçümün ortalaması ve standart sapması olarak verilmiştir. b: Pirokatekole eşdeğer fenolik içerik. ( $y = 0.0548(\mu\text{g}) + 0.0333$  ( $r^2: 0.9949$ )) c: Kersetine eşdeğer flavonoid içerik. ( $y = 0.0398(\mu\text{g}) + 0.0039$  ( $r^2: 0.9936$ )) d: Standart madde

Antioksidanlar veya oksidasyon inhibitörleri, oksidasyonu geciktiren veya önleyen ve genel olarak oksitlenebilir maddenin ömrünü uzatan bileşiklerdir. Serbest radikaller sürekli olarak üretilir ve dokulara ve biyomoleküllere büyük hasar vererek

çeşitli hastalık durumlarına yol açar. Bu nedenle antioksidan özelliği olan tıbbi bitkiler, oksidatif strese bağlı problemleri azaltmak için alternatif bir ilaç kaynağı olarak kullanılmaktadır (Nigam ve Sodhi, 2014). Tıbbi pek çok türü barındıran *Pistacia* cinsi üzerine çok sayıda toplam fenolik-flavonoid ve antioksidan aktivite çalışması mevcuttur. *P. vera* L.cv. ohadi ve kallegoçi kùltivarlarının kabukları üzerine yapılan bir çalışmada toplam fenolik ve toplam flavonoid içeriğinin sırasıyla  $17,4\pm 0,04$ ;  $17,26\pm 0,1$  mg/g DW olduğu (Azadedel ve ark., 2020), antepfıstığı kabuğunun toplam fenolik madde miktarının  $145.32\pm 7.14$  mg ve toplam flavonoid miktarının da  $92.74\pm 9.24$  µg olduğu (Şermet, 2015) ve yine reçinelerinin yüksek antioksidan aktiviteye sahip olduğu rapor edilmiştir (Sehitoglu ve ark., 2015). Yine, *P. atlantica*'nın yaprak ekstralarının BHA ve BHT gibi sentetik antioksidanlara oranla güçlü antioksidan aktivite gösterdiği (Achili ve ark., 2020; Peksel ve ark., 2010), *P. atlantica* subsp. kurdica reçinelerinin toplam fenolik içeriğinin  $147.11\pm 0.25$  ve toplam flavonoid içeriğinin  $45.55\pm 3.2$  seviyelerinde olduğu, sırasıyla yüksek oranda DPPH (%95.56) ve ABTS radikal süpürme aktivitesi (%89.9) gösterdiği (Rahman, 2018) ve *P. atlantica* subsp. atlantica yapraklarının etil asetat ekstralarının maksimum toplam fenolik-flavonoid ve antioksidan aktiviteye sahip olduğu (Benamar ve ark., 2018) tespit edilmiştir. *P. lentiscus*, yaprak ekstralarının yüksek oranda polifenol ve antioksidan aktivite gösterdiği (Yemmen ve ark., 2017), yaprak ekstralarının meyve ekstralarından daha yüksek fenolik içerik ile daha yüksek antioksidan kapasite gösterdiği (Taghizadeh ve ark., 2018), İran'da yetişen *P. khinjuk* yapraklarından elde edilen uçucu yağın ise yüksek bir fenolik içeriğe sahip olduğu (Ghajarbeygi ve ark., 2019) antioksidan testlerle saptanmıştır.

Çalışma bulgularımız yukarıda verilen literatür bulgularına paralel sonuçlar içermekte olup, bir bütün olarak değerlendirildiğinde *P. vera*'nın *In vivo* ve *In vitro* ekstralarının yüksek derecede antioksidan aktiviteye sahip oldukları görülmüştür. Toplam fenolik ve flavonoid içeriklerinin yüksek oranda bulunması bu savı doğrulamaktadır. Özellikle *In vivo* örneklerin farklı kısımlarından elde edilen ekstralarda zengin fenolik ve flavonoid bileşiklerinin bulunuşu antioksidan aktiviteleri ile benzerlik göstermektedir.

## 5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

### 5.1. Sonuçlar

Bu tez kapsamında antepfıstığı (*P. vera* L.)'nın doğal (*In vivo*) erkek ve dişi genotipler ve *In vitro* olarak yetiştirilen fidelerine ait kök, gövde ve yaprak kısımlarından, farklı konsantrasyonlarda (0, 50, 150, 250 mM) tuz elisitasyonuna maruz bırakılarak elde edilen ekstrelerin antihipertansif ve antioksidan aktiviteleri ile bazı enzimlerin inhibisyonu üzerine olan etkileri karşılaştırmalı olarak araştırılmıştır. Bu araştırmalar sonucunda aşağıdaki bulgulara ulaşılmıştır.

- ✓ Tilkat ve ark., (2008) ile Onay (2000)'in geliştirmiş oldukları *In vitro* mikroçoğaltım protokolleri kullanılarak, kontrol grupları herhangi bir BBD içermeyen MS besi ortamında başarılı bir şekilde çimlendirilmiştir. Tuz elisitasyonu denemeleri için ise tohumlar yukarıda belirtilen konsantrasyonlarda tuz içeren MS besi ortamlarında kültüre alınmıştır.
- ✓ Biyolojik aktiviteler kapsamında yaptığımız çalışmalarda, *In vivo* dişi ve erkek genotipler ile yine *In vitro* örneklere ait ekstrelerin antihipertansif aktiviteleri karşılaştırıldığında, maksimum sonuçların *In vivo* dişi yaprak ekstrelerinden elde edildiği (77,7) tespit edildiği, *In vitro* uygulamalar kendi içinde değerlendirildiğinde ise, maksimum sonucun 250 mM tuz uygulanmış kök ekstrelerine ait olduğu belirlenmiştir.
- ✓ Genel anlamda değerlendirildiğinde ise antihipertansif aktivite bakımından *In vivo* kökenli ekstrelerin *In vitro* kökenli ekstrele kıyasla daha yüksek değerlere sahip olduğu tespit edilmiştir.
- ✓ Yine aynı örneklere ait antikolinesteraz aktiviteleri değerlendirildiğinde ise, genel olarak *In vivo* ekstrelerin *In vitro* kontrol ve tuz elisitasyon uygulamalarına oranla daha yüksek AChE ve BChE enzim inhibisyonuna sahip oldukları görülmüştür. Antikolinesteraz aktivite bakımından erkek genotiplere ait kök kısımlarının en yüksek aktiviteyi gösterdikleri belirlenmiştir. Ayrıca *In vivo* kökenli ekstrelerin BChE enzim inhibisyonuna karşı daha iyi sonuçlara sahip olduğu ve standart olarak kullanılan Galantamin'e (79,22±1,82) yakın değerleri taşıdığı da tespit edilmiştir.
- ✓ Üreaz ve tirozinaz enzim inhibisyonuna ilişkin sonuçlar irdelendiğinde, *In vivo* genotiplere ait erkek kök ekstrelerinin hem antiüreaz (61,98±1,71) hem de antitirozinaz (35,28±0,27) aktivite bakımından standart olarak kullanılan tiyöüre

ve kojik asite tüm ekstreler içinde en yakın sonuçları içerdiği tespit edilmiştir. *In vivo* erkek genotiplere ait çalışılan tüm kısımların her iki enzim inhibisyonunda aktif olduğu görülmüştür. Yine *In vitro* kontrol gruplarında, yaprak ekstrelerinin diğer ekstrelerle oranla daha yüksek aktivite gösterdiği, tuz elisitasyonu yoluyla edilen edilen ekstrele bakıldığında ise, 50 (yaprak) ve 250 mM (gövde ve kök) tuz uygulamasına maruz bırakılan ekstrelerin her iki enzim inhibisyonu bakımından daha iyi değerlere sahip oldukları görülmüştür.

- ✓ Toplam fenolik-flavonoid içeriği ve antioksidan aktivitelerine ilişkin sonuçlar değerlendirildiğinde ise *In vivo* kökenli dişi kök ekstrelerinin maksimum toplam fenolik içeriğe (316,79±4,26), ve *In vivo* kökenli erkek kök ekstrelerinin ise, maksimum toplam flavonoid içeriğe (44,37±1,55) sahip olduğu görülmüştür.
- ✓ Toplam fenolik içeriğinin *In vivo* örneklerin daha çok **kök**, *In vitro* örneklerin ise **yaprak** kısımlarında, toplam flavonoid içeriğinin ise *In vivo* örneklerin daha çok **kök ve yaprak**, *In vitro* örneklerin ise, **yaprak** kısımlarında biriktiği görülmüştür. Ayrıca, 50 mM tuz elisitasyonunun, kontrol grubuna oranla gövdede toplam fenolik yapraklarda ise toplam flavonoid içeriğini arttırdığı saptanmıştır.
- ✓ Yine *In vivo* kökenli erkek yaprak ve *In vitro* kontrol grupları yaprak ekstrelerinin antioksidan testlerin çoğunda (DPPH, ABTS ve CUPRAC) sonucunda, **her iki standart sonucundan bariz bir şekilde daha yüksek antioksidan aktiviteye sahip olduğu** ve elisite edilen ekstrelerin ise uygulanan elisitasyon dozuna, elisite edilen kısma ve standart çeşidine bağlı olarak değişiklik gösterdiği tespit edilmiştir.

## 5.2. Öneriler

Farklı *In vitro* yöntemlerde *P. vera*'nın farklı kısımlarının ekstraktlarının antioksidan aktiviteye sahip olduğunu gösteren çalışmaların yanısıra ilk kez çalışmamız ile yaprak, meyve ve tohum dışında kök ve gövde kısımlarının antihipertansif, antioksidan aktiviteleri ile enzim inhibisyon özellikleri ortaya konmuştur.

İlk kez tez çalışmamız sonucunda ortaya konulan bu bilgiler ışığında, doğada yaşayan antepfıstığı ağaçlarının kök, gövde ve yaprak kısımlarının ham madde ihtiyacını teminen farmakolojik çalışmalarda kullanılmak üzere bir potansiyele sahip olduğu aşikardır. Tüm bu veriler ışığında, ticari değeri nedeniyle ülkemizde yetiştiriciliği ve seri üretimi yapılan ve ülke ticaretimizde önemli bir potansiyele sahip olan antepfıstığı bitkisinin, Kamu Üniversite ve Sanayi İşbirliği çerçevesinde de

mutlaka değerlendirilmesi gerektiği ve hem bitkinin sahip olduğu değerli sekonder bileşiklerin saflaştırılarak üretimi, hem de bitkinin farklı kısımlarının farklı amaçlarla ham madde olarak kullanımı hususlarının sanayici ve girişimcilerimiz tarafından değerlendirilmesi gerektiği kanaatindeyiz.

## KAYNAKLAR

- Achili, I., Amrani, A., Bensouici, C., Gül, F., Altun, M., Demirtas, I., Zama, D., Benayache, F., Benayache, S., 2020, Chemical constituents, antioxidant, anticholinesterase and antiproliferative effects of Algerian *Pistacia atlantica* Desf. Extracts, *Recent Patents on Food, Nutrition & Agriculture*, 11 (3), 249-256.
- Adersen, A., Gauguin, B., Gudiksen, L., Jäger, A.K., 2006, Screening of plants used in Danish folk medicine to treat memory dysfunction for acetylcholinesterase inhibitory activity, *J Ethnopharmacol.*, 104(3), 418-22.
- Ahmed, F., Urooj, A., 2010, Traditional uses, medicinal properties, and phytopharmacology of *Ficus racemosa*: A review, *Pharmaceutical Biology*, 48 (6), 672-681.
- Ahmed, Z.B., Yousfi, M., Viaene, J., Dejaegher, B., Demeyer, K., Mangelings, D., Heyden, Y.V., 2018, Potentially antidiabetic and antihypertensive compounds identified from *Pistacia atlantica* leaf extracts by LC fingerprinting. *J Pharm Biomed Anal.* 5;149:547.
- Ajila, C.M., Brar, S.K., Verma, M., Tyagi, R.D., Godbout, S., Valéro, J.R., 2011, Extraction and analysis of polyphenols: recent trends. *Crit Rev Biotechnol*, 31(3):227–249.
- Akdağ, M., Ergün, M., Özçelik, A.B., Uysal, M., 2019, Alzheimer Hastalığının Tedavisinde Kullanılan İlaçlar ve Yeni Yaklaşımlar, *Erzincan Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 12(2), 1149-1159.
- Akdemir, B., Güneş, S., Genç, A., 2009, Artificial neural network training models in prediction of concrete compressive strength using euclidean normalization method, *3<sup>rd</sup> Int. Conf. on Complex Systems and Applications-ICCSA 2009*, Le Havre-France, 160-165.
- Akdeniz M., Yener I., Yilmaz, M.A., Irtegun Kandemir, S., Tekin, F., Ertas, A. 2021, A potential species for cosmetic and pharmaceutical industries: Insight to chemical and biological investigation of naturally grown and cultivated *Salvia multicaulis* Vahl., *Industrial Crops and Products*, 168, 113566.
- Akdeniz, M., Yener, I., Ertas, A., Firat, M., Resitoglu, B., Hasimi, N., Irtegun Kandemir, S., Yilmaz, M.A., Barla Demirköz, A., Kolak, U., Oksuz, S., 2021, Biological and chemical comparison of natural and cultivated samples of *Satureja macrantha* C.A.Mey., *Records of Natural Products*, 15(6), 568-584.
- Alam, N., Yoon, K.N., Lee, J.S., 2012, Consequence of the antioxidant activities and tyrosinase inhibitory effects of various extracts from the fruiting bodies of *Pleurotus ferulae*, *Saudi J Biol Sci*, 19:111–18.
- Amira, C., Okubadejo, N.U., 2007, Frequency of complementary and alternative medicine utilization in hypertensive patients attending an urban tertiary care centre in Nigeria, *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 7,30.
- Amit, K., Priyadarsini, K.I., 2011, Free radicals, oxidative stress and importance of antioxidants in human health, *J Med Allied Sci*, 1(2),53–60.
- Anand, R., Gill, K.D., Mahdi, A.A., 2014, Therapeutics of Alzheimer's disease: Past, present and future, *Neuropharmacology* 76, 27-50.
- Anonymous, 2014a, Antep Fıstığı İşleme Tesisi Yatırım Fizibilitesi <https://www.karacadag.gov.tr>
- Anonymous, 2014b, <https://tkd.org.tr/HTBulteni/PDF/BULTEN-1-1.PDF>
- Apak, R., Güçlü, K., Özyürek, M., Karademir, S.E., 2004, Novel Total Antioxidant Capacity Index for Dietary Polyphenols and Vitamin C and E, Using Their Cupric

- Ion Reducing Capability in the Presence of Neocuproine: CUPRAC Method. *J Agric Food Chem.*, 52, 7970-7981.
- Assob, J.C., Kamga, H.L., Nsagha, D.S., 2011, Antimicrobial and toxicological activities of five medicinal plant species from Cameroon Traditional Medicine, *BMC Complement. Altern. Med.*, 11, 70-81.
- Ayaz Tilkat, E., Batibay, H., Yener, I., Koseoglu Yilmaz, P., Akdeniz, M., Holubec, V., Kaplan, A., Ercisli, S., Ertas, A., **2021**, Determination of Antihypertensive, Anticholinesterase, Antiurease, Antityrosinase, Antielastase Enzyme Inhibition and Anticancer Effects of *Pistacia khinjuk* Stocks Raised in *In vitro* and *In vivo* Conditions, *Argonomy*, 11(1), 154.
- Ayaz Tilkat, E., Kaplan, A., Tilkat, E., Bağlamış, G., Onay, A., 2019, Effects of Salt Stress on Morpho-Physiological and Biochemical Characters of Lentisk (*P. lentiscus* L.), *IJNLS*, 3(1):20-31.
- Aydın, Z., Öztürk, S., 2014, Hipertansiyon Tedavisinde Güncel Yaklaşımlar, *Haseki Tıp Bülteni*, 52, 251-255.
- Azadedel, S., Hanachi, P., Saboora A., 2020, Antioxidant Activity and Phenolic Compound Profile of Pistachio Skins (*Pistacia vera* L., Cultivars Kalleghuchi and Ohadi), *Hormozgan Medical Journal*, 1-11. DOI: [10.5812/hmj.106093](https://doi.org/10.5812/hmj.106093)
- Bakır, Ö., 2020, Sekonder Metabolitler ve Roller, *UAZİMDER*, 2(4):39-45.
- Bakır, D., Akdeniz, M., Ertas, A., Yilmaz, M.A., Yener, I., Firat, M., Kolak, U., 2020, A GC-MS method validation for quantitative investigation of some chemical markers in *Salvia hypargeia* Fisch. & C.A. Mey. of Turkey: Enzyme inhibitory potential of ferruginol, *Journal of Food Biochemistry*, 44: e13350. <https://doi.org/10.1111/jfbc.13350>.
- Balasuriya, B.W.N., Vasantha Rupasinghe, H.P.V., 2011, Plant flavonoids as angiotensin converting enzyme inhibitors in regulation of hypertension, *Functional Foods in Health and Disease*, 5: 172-188.
- Benamar, H., Marouf, A., Bennaceur M., 2018, Phytochemical composition, antioxidant and acetylcholinesterase inhibitory activities of aqueous extract and fractions of *Pistacia atlantica* subsp. *atlantica* from Algeria, *Journal of Herbs, Spices & Medicinal Plants*, 24(3), 229-244, DOI: [10.1080/10496475.2018.1446204](https://doi.org/10.1080/10496475.2018.1446204)
- Benmahioul, B., Daguin, F., Kaid-Harche, M., 2009, Effect of salt stress on germination and growth *In vitro* of the pistachio (*Pistacia vera* L.), *Comptes Rendus Biologies*, 332, 752-758.
- Benmahioul, B., Dorion, N., Kaid-Harche, M., Daguin, F., 2012, Micropropagation and ex vitro rooting of pistachio (*Pistacia vera* L.), *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 108, 353-358.
- Bilgin Sökmen, B., Aydın, S., Şahin, Y., Akyurt, İ., 2016, Üreaz ve Elastaz Aktivitelerine Giresun'dan Toplanan *Cystoseira barbata* (Stackhouse) C. Agardh Deniz Yosununun İnhibisyon Etkisinin İncelenmesi, *Karadeniz Fen Bilimleri Dergisi*, 6(14), 124-131.
- Biswas, S.K., McClure, D., Jimenez, L.A., Megson, I.L., Rahman, I., 2005, Curcumin induces glutathione biosynthesis and inhibits NF-kappaB activation and interleukin-8 release in alveolar epithelial cells: mechanism of free radical scavenging activity, *Antioxid Redox Signal*, 7(1-2),32-41.
- Blois, M.S., 1958, Antioxidant determinations by the Use of a Stable Free Radical, *Nature*, 181,1199-1200.
- Bozorgi, M., Memariani, Z., Mobli, M., Salehi Surmaghi, M.H., Shams-Ardekani, M.R., ve Rahimi, R. (2013). Five *Pistacia* species (*P. vera*, *P. atlantica*, *P.*

- terebinthus*, *P. khinjuk*, and *P. lentiscus*): A Review of Their Traditional Uses, Phytochemistry, and Pharmacology. *The Scientific World Journal*, 219815, 1- 33.
- Burnett, C.L., Bergfeld, W.F., Belsito, D.V., Hill, R.A., Klaassen, C.D., Liebler, D.C., Marks, J.G. Jr, Shank, R.C., Slaga, T.J., Snyder, P.W., Andersen, F.A., 2010, Final report of the safety assessment of Kojic acid as used in cosmetics, *Int J Toxicol.* 29(6), 244-73.
- Chen, Y., Liao, J., Chen, M., Huang, Q., Lu, Q., 2015, Gossypol: new class of urease inhibitors, molecular docking and inhibition assay, *J Chem Pharm Res.*, 7(1), 10-15.
- Çalışkan, T., Hatipoğlu, R., Kırıcı, S. 2019, Production of Plant Secondary Metabolites from Cell and Organ Cultures under *In vitro* Conditions, *Turkish Journal of Agriculture - Food Science and Technology*, 7(7), 971-980.
- Çağlar, A., Tomar, O., Vatansever, H., Ekmekçi. E., 2017, Antepfıstığı (*Pistacia vera* L.) ve İnsan Sağlığı Üzerine Etkileri, *Akademik Gıda* 15(4), 436-447.
- Dağüstü, N., 2018, Bitki Doku Kültürü Uygulamalarının Islah Çalışmalarında Kullanılması, *TÜRKTOB Dergisi* 25: 23-26.
- Delijam, M.A., Garoosi, G.A., Nezami-Alanagh, E., Hosseini, R., 2016, Improving *Pistacia vera* micropropagation: with emphasis on the efficiency of minerals, vitamins and PGRs. *J Plant Mol Breed*, 4:43-54.
- Demir, T., Akpınar, Ö., 2020, Biological Activities of Phytochemicals in Plants, *Turkish Journal of Agriculture - Food Science and Technology*, 8(8), 1734-1746.
- Edwards, R.L., Lyon, T., Litwin, S.E., Rabovsky, A., Symons, J.D., Jalili, T., 2007, Quercetin reduces blood pressure in hypertensive subjects, *J. Nutr.*, 137, 2405-2411.
- Eghbali-Feriz, S., Taleghani, A., Al-Najjar, H., 2018, Antimelanogenesis and anti-tyrosinase properties of *Pistacia atlantica* subsp. *mutica* extracts on B16F10 murine melanoma cells, *Res Pharm Sci.* 13(6),533-545.
- Ekim, M., 2018, Hipertansiyon Tedavisinde Beslenmenin ve Yaşam Tarzı Değişikliklerinin Önemi, *Bozok Tıp Derg.* 8(2),80-5.
- Ellman, G.L., Courtney, K.D., Andres, V., Featherstone, R.M., 1961, A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity, *Biochemical Pharmacology*, 7: 88-95.
- Erbek, M., 2019, Alzheimer Hastalarının Tedavisinde Bahçe Tasarımının Peyzaj Mimarlığı Açısından İrdelenmesi, Süleyman Demirel Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi.
- Erci, B., Elibol, M. ve Aktürk, Ü. 2018, Hipertansiyon hastalarının tedaviye uyumunu ve yaşam kalitesini etkileyen faktörlerin incelenmesi. *FNJN Florence Nightingale Hemşirelik Dergisi*, 26(2), 79-92.
- Ertas, A., Cakirca, H., Yener, I., Akdeniz, M., Firat, M., Topcu, G., Kolak, U., 2021a, Bioguided isolation of secondary metabolites from *Salvia cerino-pruinosa* Rech. f. var. *cerino-pruinosa*, *Records of Natural Products*, 15(6), 568-584.
- Ertas, A., Firat, M., Yener, I., Akdeniz, M., Yigitkan, S., Bakir, D., Çakır, C., Yilmaz, M.A., Ozturk, M., Kolak, U., 2021b, Phytochemical fingerprints and bioactivities of ripe disseminules (Fruit-Seeds) of seventeen *Gundelia* (Kenger-kereng diken) species from Anatolia with chemometric approach, *Chemistry & Biodiversity*, <https://doi.org/10.1002/cbdv.202100207>
- Ertas, A., Yener, I., 2020, A comprehensive study on chemical and biological profiles of three herbal teas in Anatolia; rosmarinic and chlorogenic acids, *South African Journal of Botany*, 130, 274-281.

- Ertürk, Y.E., Geçer, M.K., Gülsoy, E., Yalçın, S., 2015, Antepfıstığı Üretimi ve Pazarlaması, *Iğdır Univ. J. Inst. Sci. & Tech.*, 5(2), 43-62.
- Ferreira, A., Proença, C., Serralheiro, M.L.M., Araújo, M.E.M., 2006, The *In vitro* screening for acetylcholinesterase inhibition and antioxidant activity of medicinal plants from Portugal, *J. Ethnopharmacol.*, 108, 31-37.
- Ghajarbeygi, P., Hajhoseini, A., Hosseini, M.S., Sharifan, A., 2019, An *In vitro* and *In vivo* Cholinesterase Inhibitory Activity of *Pistacia khinjuk* and *Allium sativum*, *Essential Oils. J Pharmacopuncture*, 22(4),231-238.
- Güven, A., Gürsul, I., 2014, Bitki Doku Kültürlerinde Sekonder Metabolit Sentezi, *GIDA* 39 (5): 299-306.
- Hamid, A.A., Aiyelaagbe, O.O., Usman, L.A., Ameen, O.M., Lawal, A., 2010, Antioxidants: its medicinal and pharmacological applications, *Afr J Pure Appl Chem*, 4(8),142-151.
- Hearing, VJ., Jiménez, M., 1987. Mammalian tyrosinase the critical regulatory control point in melanocyte pigmentation, *International Journal of Biochemistry*,19,1141-7.
- Hina, Z., Ghazala, H.R., Arfa, K., Huma, S., Sabiha, T., Ajmal, K., 2015. Anti-urease Activity of *Mimusops elengi* Linn (Sapotaceae), *European Journal of Medicinal Plants*, 6, 223-230.
- Hirayama, C., Sugimura, M., Saito, H., Nakamura, M., 2000, Purification and properties of urease from leaf of mulberry, *Morus alba*. *Phytochemistry*, 53:325-330.
- Houghton, P.J., Howes, M.J., 2005. Natural Products and Derivatives Affecting Neurotransmission Relevant to Alzheimer's and Parkinson's Disease, *Neurosignals*, 14(1-2), 6-22.
- Hussain, A., Ahmed, I., Nazir, H., Ullah, I., 2012, Plant Tissue Culture: Current Status and Opportunities, *Recent Advances in Plant In vitro Culture*, Intech publishing, 10.5772/50568.
- İnci, Ş., Kırbağ, S., 2019, *Pistacia vera* L.'nin Dış Kabuğunun Antimikrobiyal Etkisi, *BEÜ Fen Bilimleri Dergisi*, 8(4), 1218-1222.
- Izol, E., Temel, H., Yılmaz, M.A., Yener, İ., Tokul-Olmez, O., Kaplaner, E., Fırat, M., Hasimi, N., Ozturk, M., Ertas, A., 2021, A detailed chemical and biological investigation of twelve *Allium* species from Eastern Anatolia with chemometric studies, *Chemistry and Biodiversity*, 18, e2000560. <https://doi.org/10.1002/cbdv.202000560>
- Kafarski, P., Talma, M., 2018, Recent advances in design of new urease inhibitors: A review, *Journal of Advanced Research*, 13,101-112.
- Kamali, A., Owji, A., 2016, Agro-ecological requirements for growing pistachio trees: A Literature Review, *Elixir Agriculture*, 96, 41450-41454.
- Karacan, E., Ceylan, R.F., 2020, Factors affecting pistachio exports in Turkey, Iran and the USA, *Int. J. Agric. For. Life Sci.*, 4(2), 255-262.
- Kemeç Hürkan, Y., 2020, Tarımsal ve Endüstriyel Biyoteknoloji Uygulamaları-Biyoekonomi (Ed: Kaan Hürkan); *Bitki Biyoteknolojisinde Doku Kültürü Yöntemleri*, 1, 71-121.
- Kepekçi, Y., Boğa, C., Yılmaz, M., 1991, Diabetes Mellitus'ta antep fıstığına karşı kan glikoz cevabının glisemik indeks ile araştırılması, *Beslenme ve Diyet Dergisi*, 20, 221-34.
- Kim, N.Y., Kwon, H.S., Lee, H.Y., 2017, Effect of inhibition on tyrosinase and melanogenesis of *Agastache rugosa* Kuntze by lactic acid bacteria fermentation, *J Cosmet Dermatol.*, 16, 407-415.

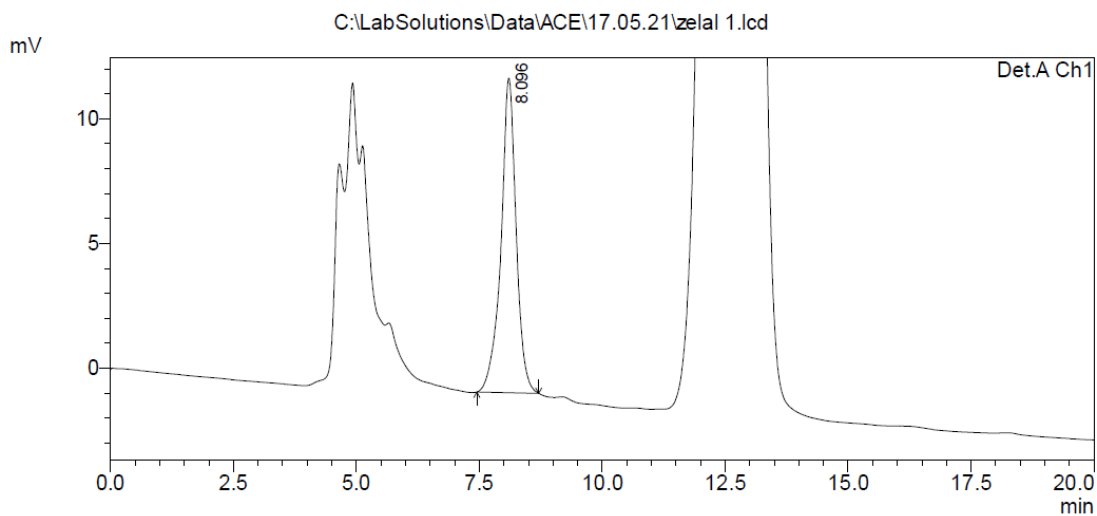
- Lee, S.G., Karadeniz, F., Seo, Y., Kong, C.S., 2017. Anti-melanogenic effects of flavonoid glycosides from *Limonium tetragonum* (thunb.) bullock via inhibition of tyrosinase and tyrosinase-related proteins, *Molecules*, 22,1480–90.
- Lin, Y.S., Chen, H.J., Huang, J.P., et al., 2017, Kinetics of tyrosinase inhibitory activity using *Vitis vinifera* leaf extracts, *BioMed Research International*, Article ID 5232680.
- Macegoniuk, K., 2013, Inhibitors of bacterial and plants urease. A review, *Folia BioOecol*, 9,9-16.
- Mahernia, S., Bagherzadeh, K., Mojab, F., Amanlou, M., 2015, Urease Inhibitory Activities of Some Commonly Consumed Herbal Medicines. *Iran. J. Pharm. Sci.*, 14, 943-947.
- Mansoor, F., Anis, I., Khan, A., Marasini, B.P., Choudhary, M.I., Shah, M.R., 2014, Urease inhibitory constituents from *Daphne retusa*, *Journal of Asian Natural Products Research*, 16(2), 210-215.
- Martorana, M., Arcoraci, T., Rizza, L., Cristani, M., Bonina, F.P., Saija, A., Trombetta, D., Tomaino, A., 2013, *In vitro* antioxidant and *In vivo* photoprotective effect of pistachio (*Pistacia vera* L., variety Bronte) seed and skin extracts, *Fitoterapia*, 85, 41-48.
- Moreno, C.S., Park, S., Nelson, K., Ashby, D., Hubale, F., Lane, W.S., Pallas, D.C., 2000, WD40 Repeat Proteins Striatin and S/G2 Nuclear Autoantigen are Members of a Novel Family of Calmodulin-Binding Proteins That Associate with Protein Phosphatase 2A., *J Biol Chem*. 275(8), 5257-5263.
- Mukherjee, K., Biswas, R., Sharma, A., Banerjee, S., Biswas, S., Katiyar, C.K., 2018, Validation of medicinal herbs for anti-tyrosinase potential, *Journal of Herbal Medicine*, 14, 1–16.
- Nigam, V., Sodhi J.S., 2014, Some Medicinal Plants With Antioxidant Activity- A Review, *IJPBS*, 4(1): 173-178.
- Oh, H., Kang, D.G., Kwon, J.W., Kwon, T.O., Lee, S.Y., Lee, D.B., Lee, H.B., 2004, Isolation of angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitory flavonoids from *Sedum sarmentosum*, *Biol Pharm Bull.*, 27,2035-7.
- Onay, A., 2000, Histology of somatic embryo initiation and development in pistachio (*Pistacia vera* L.). *Turkish Journal of Botany*. 24, 91-95.
- Onay, A., Yıldırım, H., Pirinç, V., Tilkat, E., Çiftçi, Y.Ö., Akdemir, H., Süzerer, V., Çalar, N., Binici, M., Akdemir, O.F., Kılınç, F.M., 2012, Bitkilerin Biyoteknolojik Yöntemlerle Ticari Çoğaltımı; Mevcut Durum ve Gelecekteki Durum, *Batman Üniversitesi Journal of Life Sciences*, 1(2), 11-27.
- Orhan, I., Kartal, M., Naz, Q., Ejaz, A., Yılmaz, G., Kan, Y., Konuklugil, B., Åžener, B., Choudhary, M.I., 2007, Antioxidant and anticholinesterase evaluation of selected Turkish *Salvia* species. *Food Chem.*,103,1247-1254.
- Oskay, D., Oskay, M., 2009, Bitki Sekonder Metabolitlerinin Biyoteknolojik Önemi, *Ecological Life Sciences*, 4(2), 31-41.
- Özden Tokatlı, Y., 2005, Antepfıstığı (*Pistacia vera* L.) bitkisinin doku kültürü yöntemleri ile *In vitro* rejenerasyonu ve mikroçoğaltımı, Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsü, Mühendislik ve Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Yüksek lisans tezi.
- Peksel, A., Arisan-Atac, I., Yanardag, R., 2010, Evaluation of antioxidant and anti acetylcholinesterase activities of the extracts of *P. atlantica* Desf. leaves, *Journal of Food Biochemistry*, 34 (3), 451-476.

- Pillaiyar, T., Manickam, M., Namasivayam, V., 2017, Skin whitening agents: medicinal chemistry perspective of tyrosinase inhibitors, *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 32(1), 403-425.
- Rahman, H.S., 2018, Phytochemical analysis and antioxidant and anticancer activities of mastic gum resin from *Pistacia atlantica* subspecies *kurdica*, *OncoTargets and Therapy*,(11); 4559-4572.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., Rice-Evans, C., 1999, Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay, *Free Radic. Biol. Med.*, 26,1231-1237.
- Real Guerra, R., Stanisçuaski, F., Carlini, C.R., 2013, Soybean urease: over a hundred years of knowledge. A comprehensive survey of international soybean research – genetics, physiology, agronomy and nitrogen relationships, 39, Board, J.E., InTech, 318.
- Sarkar, R., Arora, P., Garg, K.V., 2013, Cosmeceuticals for hyperpigmentation: What is available? *J Cutan Aesthet Surg*, 6,4-11.
- Seçmen, Ö., Gemici, Y., Görk, G., Leblebici, E. ve Bekat, L., 2008, Tohumlu Bitkiler Sistematığı, Ege Univ. Yayınları, İzmir, s. 446.
- Sedefoğlu, C., 2013, Antep Fıstıklarında Okratoksin A ve Aflatoksin Varlığının İncelenmesi, İstanbul Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi.
- Sehitoglu, M.H., Han, H., Kalin, P., Gülçin, İ., Ozkan, A., Aboul-Enein, H.Y., 2015, Pistachio (*Pistacia vera* L.) gum: a potent inhibitor of reactive oxygen species, *J Enzyme Inhib Med Chem*. 30(2),264-9.
- Slinkard, K., Singleton, V.L., 1977, Total Phenol Analyses: Automation and Comparison With Manual Methods. *ACEV.*, 28, 49-55.
- Sultana, S., Asif, H.M., 2017, Medicinal plants combating against hypertension: A green antihypertensive approach, *Pak. J. Pharm. Sci.*, 30(6), 2311-2319.
- Şermet, M.Ö., 2015, *Pistacia vera* L. Kabuğunun Antioksidan, Antimikrobiyal Aktivitesi ve Fitokimyasal Analizi, Orta Doğu Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi.
- Şimşek, M., Gülsoy, E., 2018, A Review on Organic Pistachio Growth and Development Opportunities in Turkey, *International Journal of Agriculture and Wildlife Science*, 4(1), 89-93.
- Taghizadeh, F., Davarynejad, G., Asili, J., Nemati, H., Karimi, G., 2018, Assessment of phenolic profile and antioxidant power of five pistachio (*Pistacia vera* L.) cultivars collected from four geographical regions of Iran, *Avicenna J Phytomed*, 8 (1): 33-42.
- Taherkhani, M., 2017, Chemical constituents, total phenolic content, antimicrobial, antioxidant and radical scavenging properties, chelating ability, tyrosinase inhibition and *In vitro* cytotoxic effects of *Artemisia aucheri* herbs, *Pharm Chem J.*, 50,736-45.
- Teresa, M.M., Magdalena, W., Andrzej, K.A., 2011, Systematic review of the effect of vitamin C infusion and vitamin E-coated membrane on hemodialysis-induced oxidative stress, Intech DOI:10.5772/22542.
- Tilkat, E., 2006, Erkek Antep fıstığı (*Pistacia vera* L. cv. 'Atlı') ağaçlarının *In vitro* mikro çoğaltılması. Dicle Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Doktora Tezi.
- Tilkat, E., Onay, A., Özen, H.Ç., 2008, Erkek Antepfıstığı Ağaçlarının (*Pistacia vera* L.) *İn vitro* Mikroçoğaltılması. *Fırat Üniv. Fen ve Müh. Bil. Dergisi*, 20(1), 15-22.

- Uddin, G., Abdur Rauf, I., Raza, M., Khan, H., MajidKhan,N., Farooq, U., Khan, A. 2015, Urease inhibitory profile of extracts andchemical constituents of *Pistacia atlantica* ssp. *cabulica* Stocks, *Natural Product Research: FormerlyNatural Product Letters*. DOI: 10.1080/14786419.2015.1062378.
- Upadhyay, L.S., 2012, Urease inhibitors: A review., *Indian Journal of Biotechnology*, 11, 381-388.
- Verma, T., Sinha, M., Bansal, N. *et al.* 2021, Plants Used as Antihypertensive. *Nat. Prod. Bioprospect.* 11, 155-184.
- Villareal, M.O., Kume, S., Neffati, M., Isoda, H., 2017, Upregulation of Mitf by phenolic compounds-rich cymbopogon schoenanthus treatment promotes melanogenesis in b16 melanoma cells and human epidermal melanocytes, *BioMed Research International*, 1-11.
- Yağcı Tüzün, C., 2011, *Gentiana Olivieri* Griseb.'de Kallus ve Süspansiyon Kültürlerinde Bulunan Bazı Sekonder Metabolitler, Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Doktora Tezi.
- Yemmen, M., Landolsi, A., Ben Hamida, J., Mégraud, F., Trabelsi Ayadi, M., 2017, Antioxidant activities, anticancer activity and polyphenolics profile, of leaf, fruit and stem extracts of *Pistacia lentiscus* from Tunisia, *Cell Mol Biol.*, 63(9), 87-95.
- Yılmaz, A., 2011, *Nepeta sorgerae* ve *Nepeta obtusicrena* Bitkilerinin Antioksidan ve Anti-Alzheimer Bileşenlerinin İzolasyonu ve Yapılarının Belirlenmesi, İstanbul Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi.
- Zehir Kırkbir, G., 2018, Yeni Sentezlenmiş 1,2,4-Merkapto Triazol Bileşiklerinin Üreaz Aktivitesi Üzerine Etkisinin *In vitro* ve *In Silico* Olarak İncelenmesi, Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi.

**EKLER****EK-1** *In vivo* erkek yaprak ekstrelerine ait LC-MS/MS kromatogramı

&lt;Chromatogram&gt;



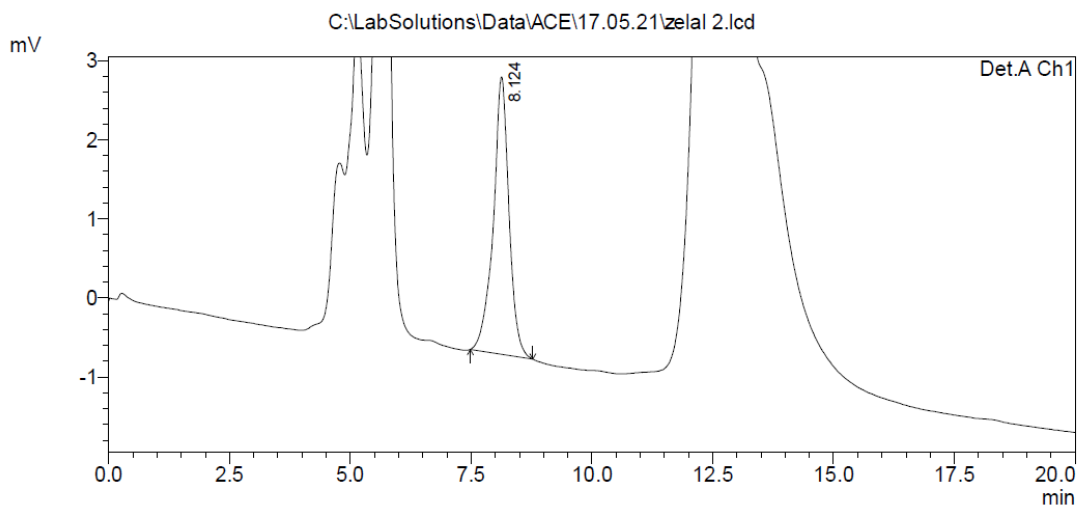
PeakTable

Detector A Ch1 228nm

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Area %	Height %
1	8.096	271572	12618	100.000	100.000
Total		271572	12618	100.000	100.000

**EK-2** *In vivo* dişi yaprak ekstrelerine ait LC-MS/MS kromatogramı

&lt;Chromatogram&gt;



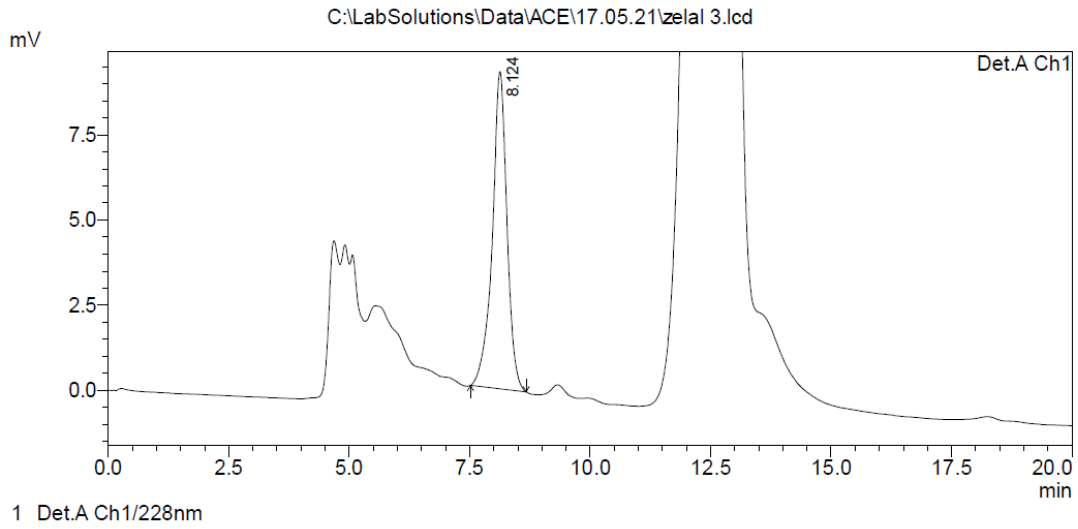
PeakTable

Detector A Ch1 228nm

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Area %	Height %
1	8.124	79357	3507	100.000	100.000
Total		79357	3507	100.000	100.000

**EK-3** *In vivo* erkek gövde ekstrelerine ait LC-MS/MS kromatogramı

## &lt;Chromatogram&gt;



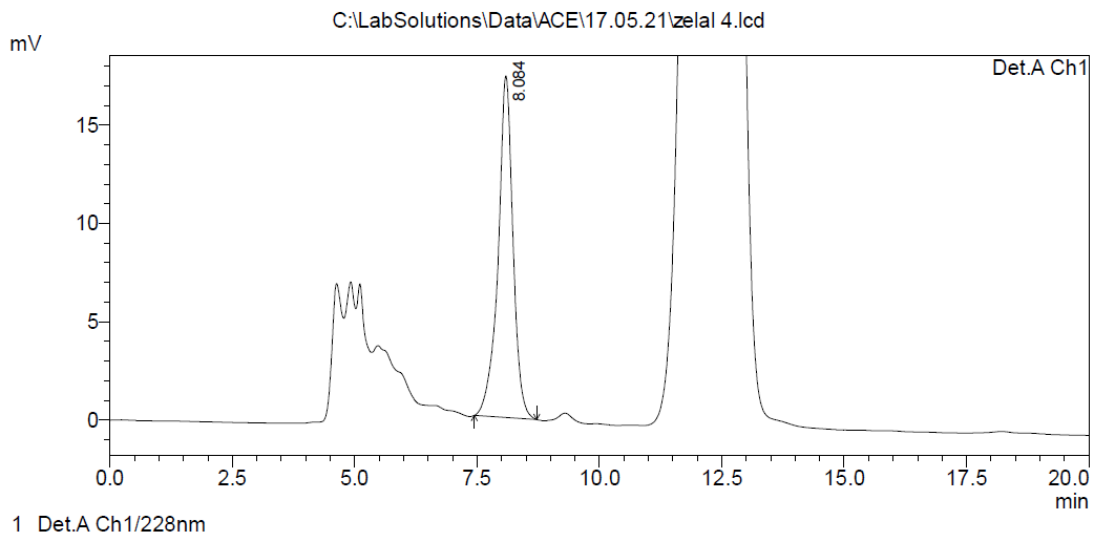
PeakTable

Detector A Ch1 228nm

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Area %	Height %
1	8.124	197624	9313	100.000	100.000
Total		197624	9313	100.000	100.000

**EK-4** *In vivo* dişi gövde ekstrelerine ait LC-MS/MS kromatogramı

## &lt;Chromatogram&gt;



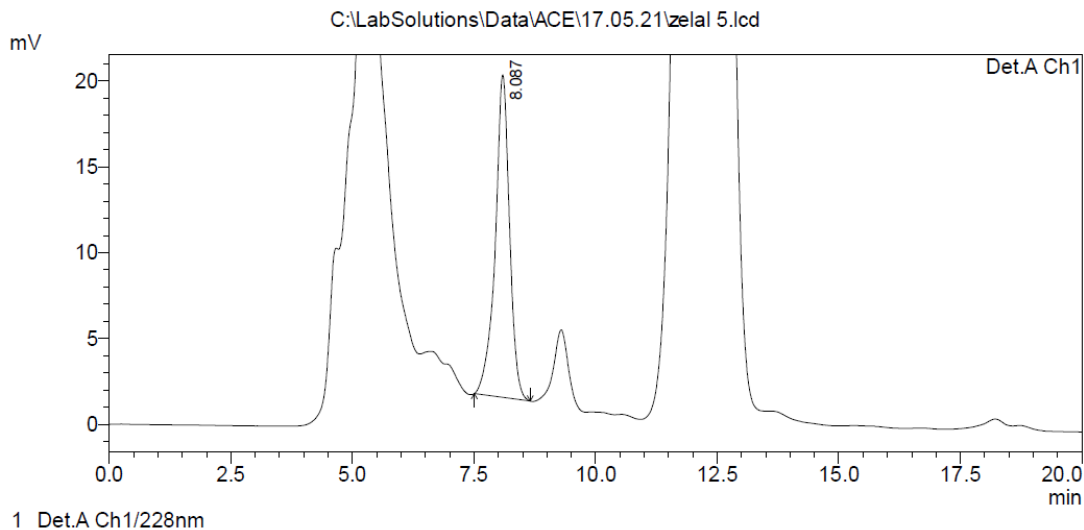
PeakTable

Detector A Ch1 228nm

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Area %	Height %
1	8.084	368610	17378	100.000	100.000
Total		368610	17378	100.000	100.000

**EK-5** *In vivo* erkek kök ekstrlerine ait LC-MS/MS kromatogramı

## &lt;Chromatogram&gt;



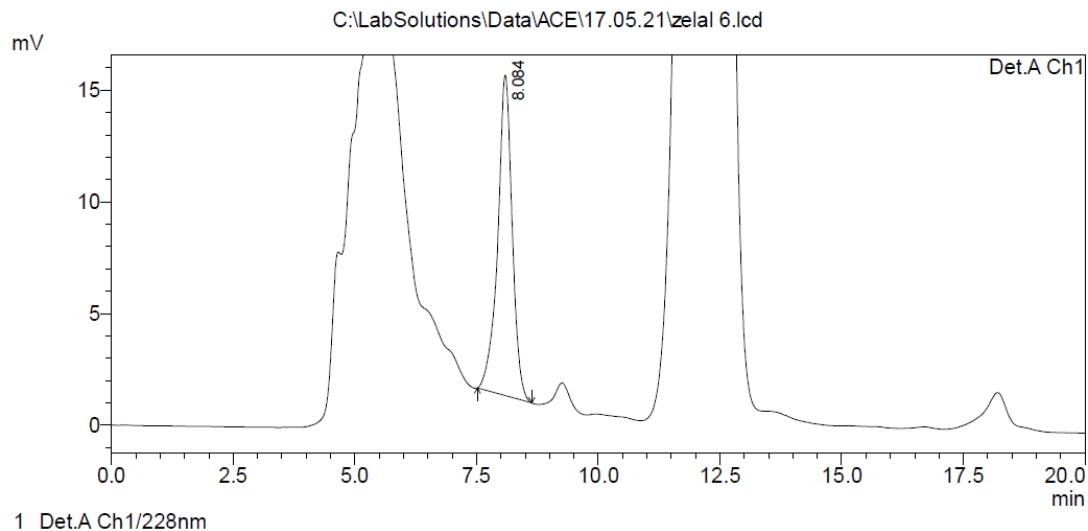
PeakTable

Detector A Ch1 228nm

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Area %	Height %
1	8.087	385394	18795	100.000	100.000
Total		385394	18795	100.000	100.000

**EK-6** *In vivo* dişi kök ekstrlerine ait LC-MS/MS kromatogramı

## &lt;Chromatogram&gt;



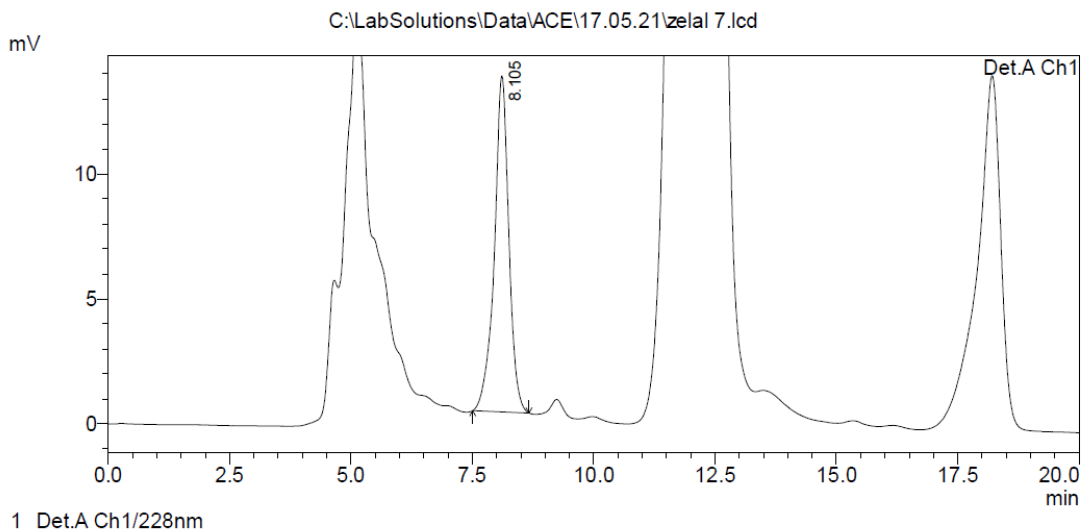
PeakTable

Detector A Ch1 228nm

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Area %	Height %
1	8.084	297344	14348	100.000	100.000
Total		297344	14348	100.000	100.000

**EK-7** *In vitro* kontrol yaprak ekstrelerine ait LC-MS/MS kromatogramı

## &lt;Chromatogram&gt;



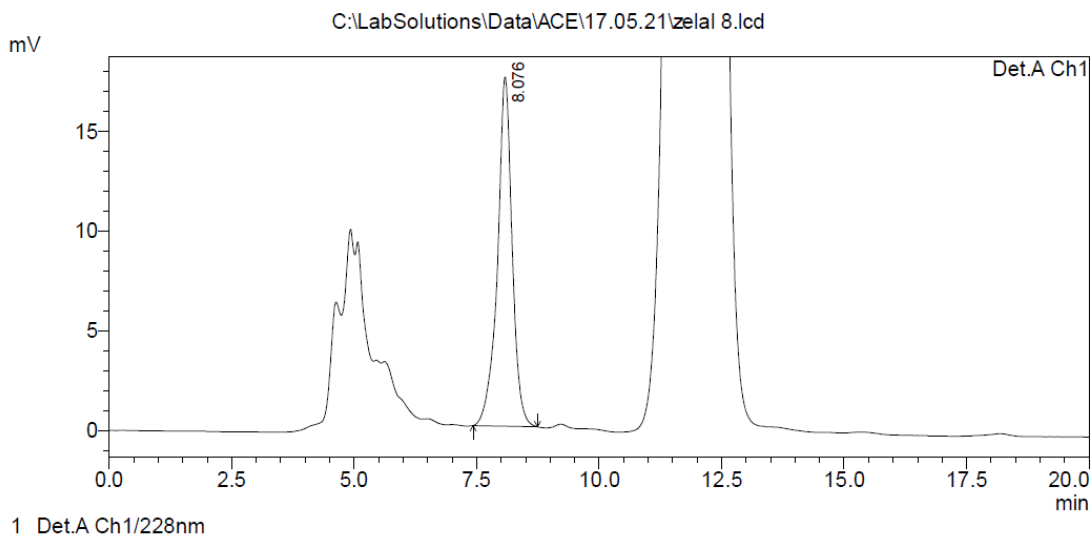
PeakTable

Detector A Ch1 228nm

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Area %	Height %
1	8.105	279880	13445	100.000	100.000
Total		279880	13445	100.000	100.000

**EK-8** *In vitro* kontrol gövde ekstrelerine ait LC-MS/MS kromatogramı

## &lt;Chromatogram&gt;



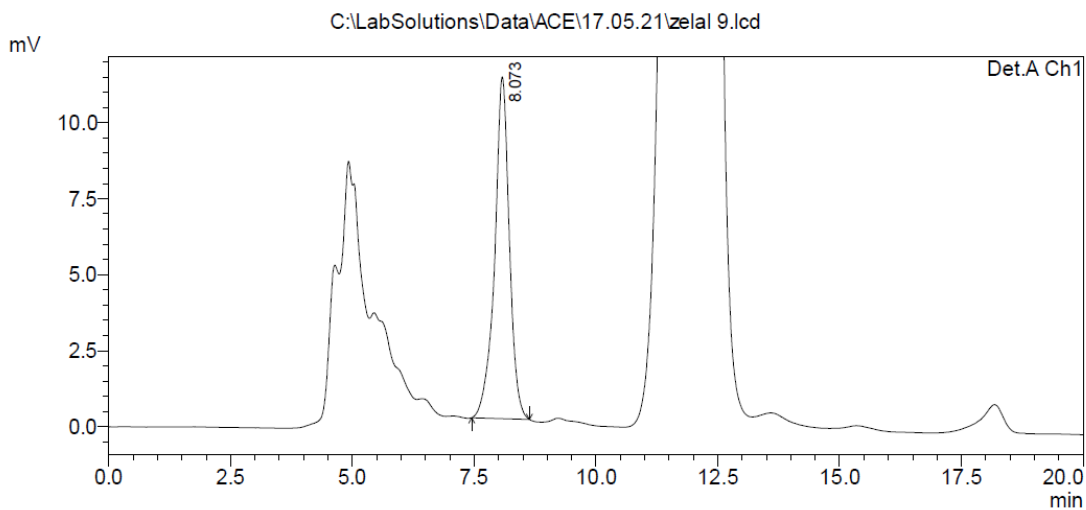
PeakTable

Detector A Ch1 228nm

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Area %	Height %
1	8.076	365745	17523	100.000	100.000
Total		365745	17523	100.000	100.000

**EK-9** *In vitro* kontrol kök ekstrilerine ait LC-MS/MS kromatogramı

## &lt;Chromatogram&gt;



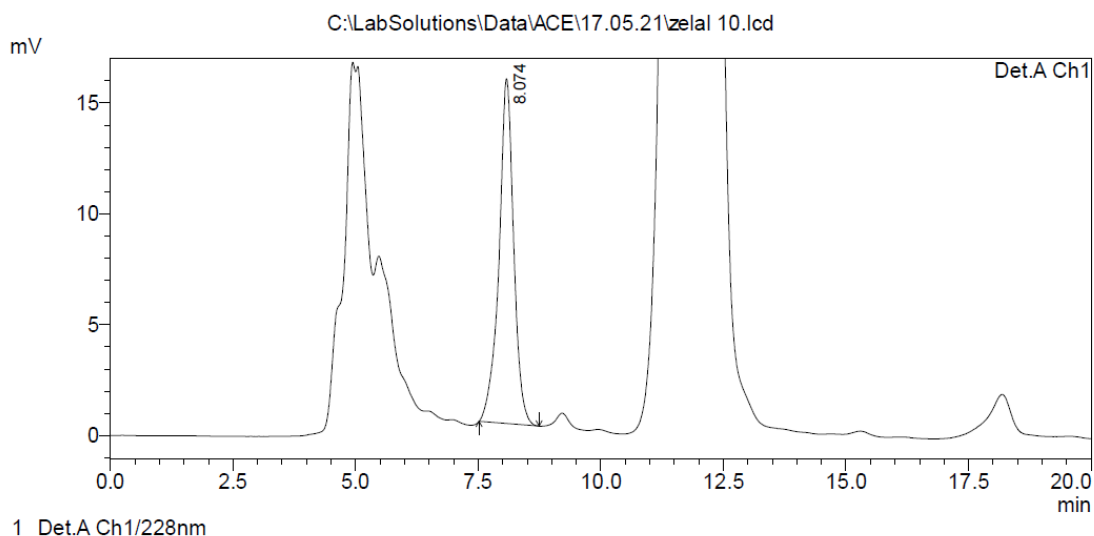
PeakTable

Detector A Ch1 228nm

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Area %	Height %
1	8.073	236307	11234	100.000	100.000
Total		236307	11234	100.000	100.000

**EK-10** 50 mM tuz uygulanmış *In vitro* yaprak ekstrilerine ait LC-MS/MS kromatogramı

## &lt;Chromatogram&gt;



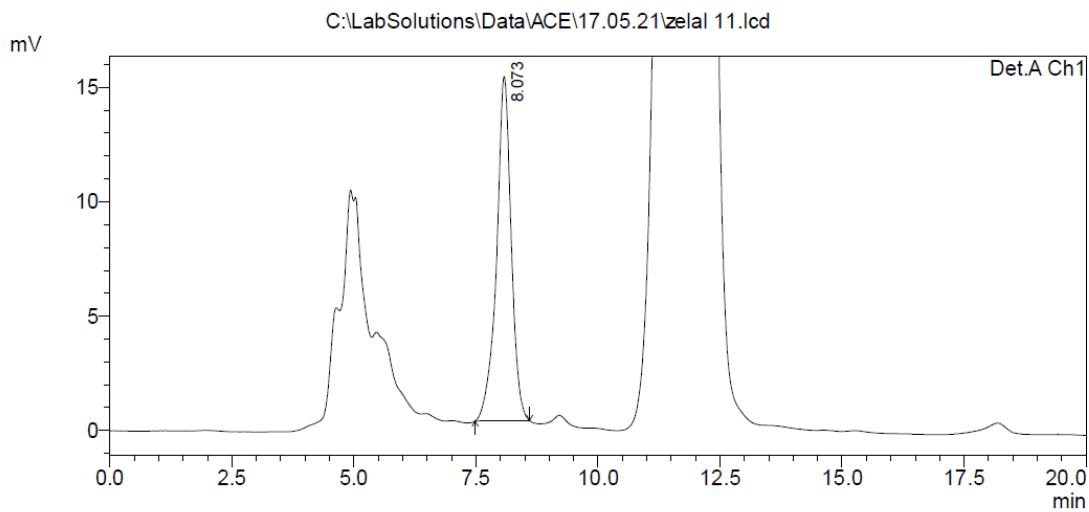
PeakTable

Detector A Ch1 228nm

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Area %	Height %
1	8.074	326037	15553	100.000	100.000
Total		326037	15553	100.000	100.000

**EK-11** 50 mM tuz uygulanmış *In vitro* gövde ekstrelerine ait LC-MS/MS kromatogramı

<Chromatogram>



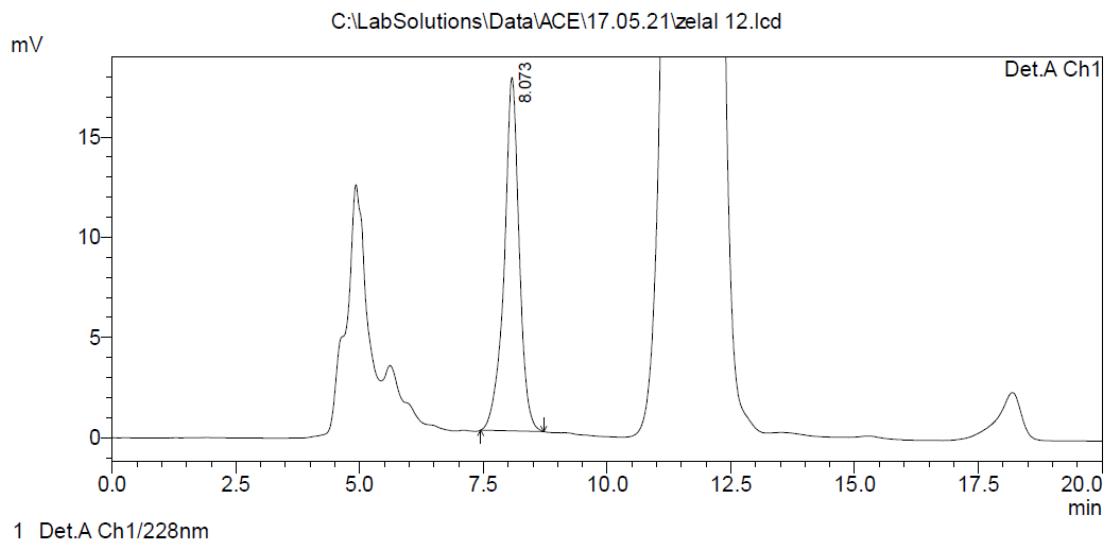
PeakTable

Detector A Ch1 228nm

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Area %	Height %
1	8.073	314722	15051	100.000	100.000
Total		314722	15051	100.000	100.000

**EK-12** 50 mM tuz uygulanmış *In vitro* kök ekstrelerine ait LC-MS/MS kromatogramı

<Chromatogram>



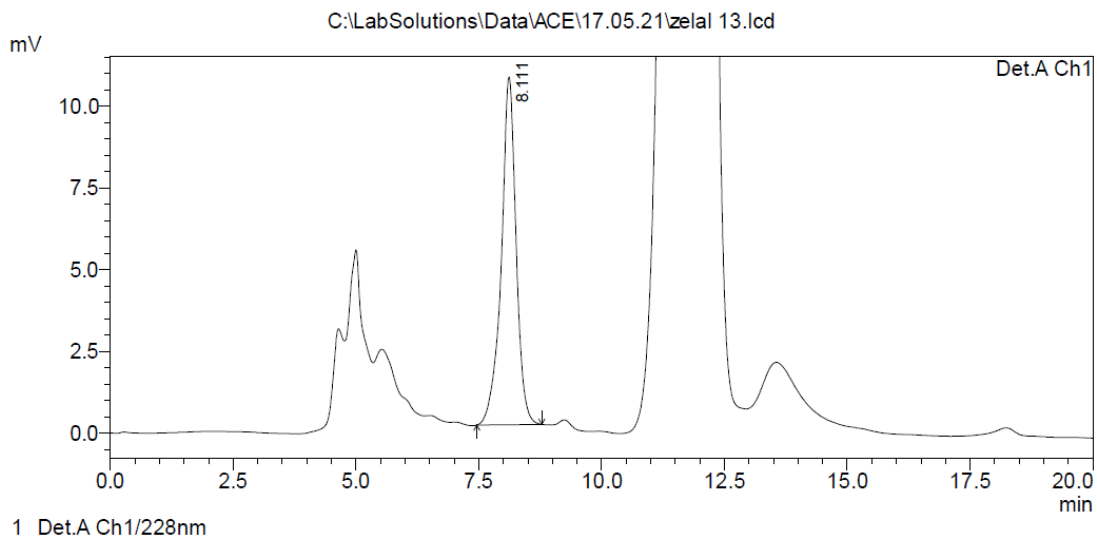
PeakTable

Detector A Ch1 228nm

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Area %	Height %
1	8.073	373072	17628	100.000	100.000
Total		373072	17628	100.000	100.000

**EK-13** 150 mM tuz uygulanmış *In vitro* yaprak ekstrelerine ait LC-MS/MS kromatogramı

<Chromatogram>



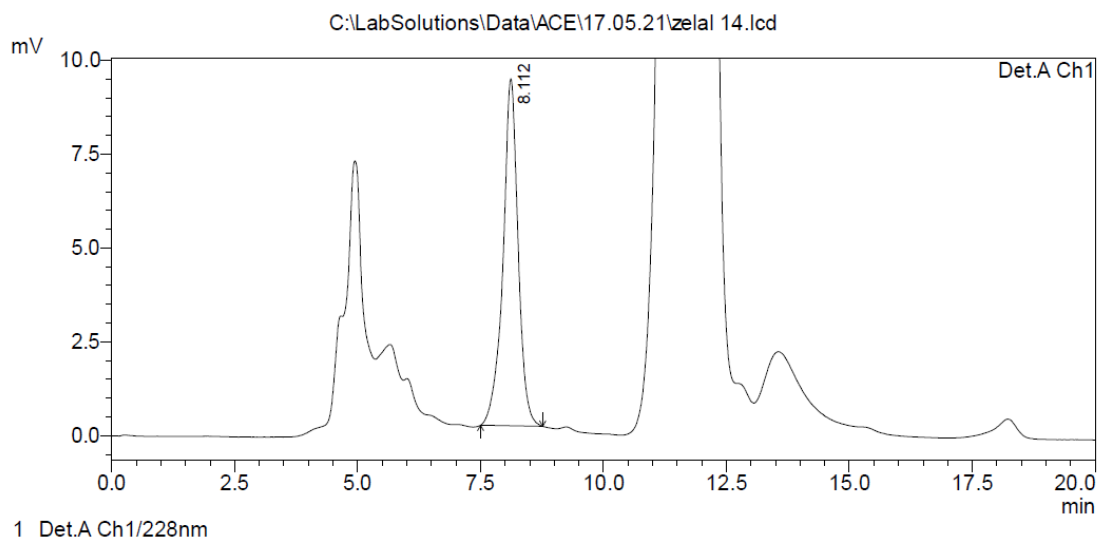
PeakTable

Detector A Ch1 228nm

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Area %	Height %
1	8.111	223848	10652	100.000	100.000
Total		223848	10652	100.000	100.000

**EK-14** 150 mM tuz uygulanmış *In vitro* gövde ekstrelerine ait LC-MS/MS kromatogramı

<Chromatogram>



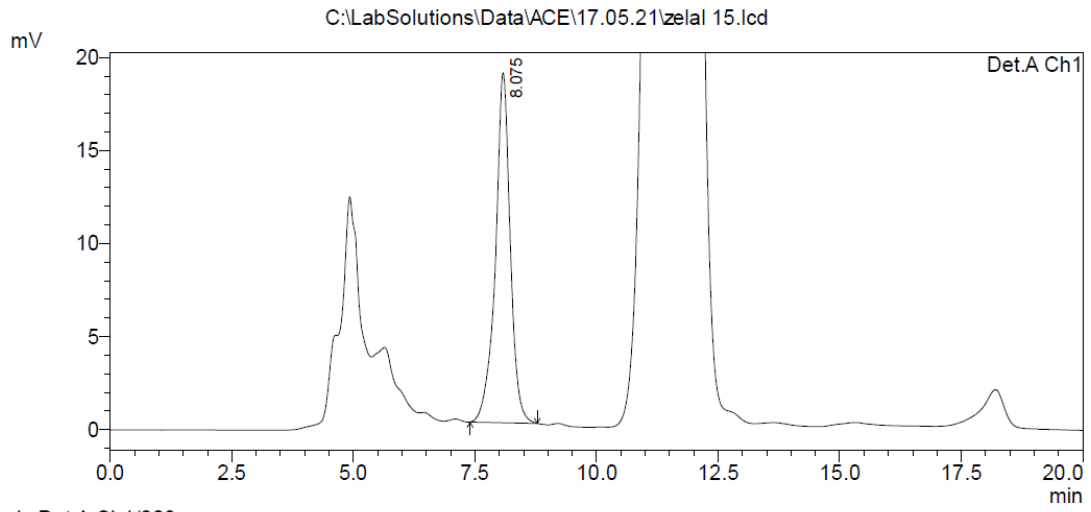
PeakTable

Detector A Ch1 228nm

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Area %	Height %
1	8.112	197972	9248	100.000	100.000
Total		197972	9248	100.000	100.000

**EK-15** 150 mM tuz uygulanmış *In vitro* kök ekstrelerine ait LC-MS/MS kromatogramı

<Chromatogram>

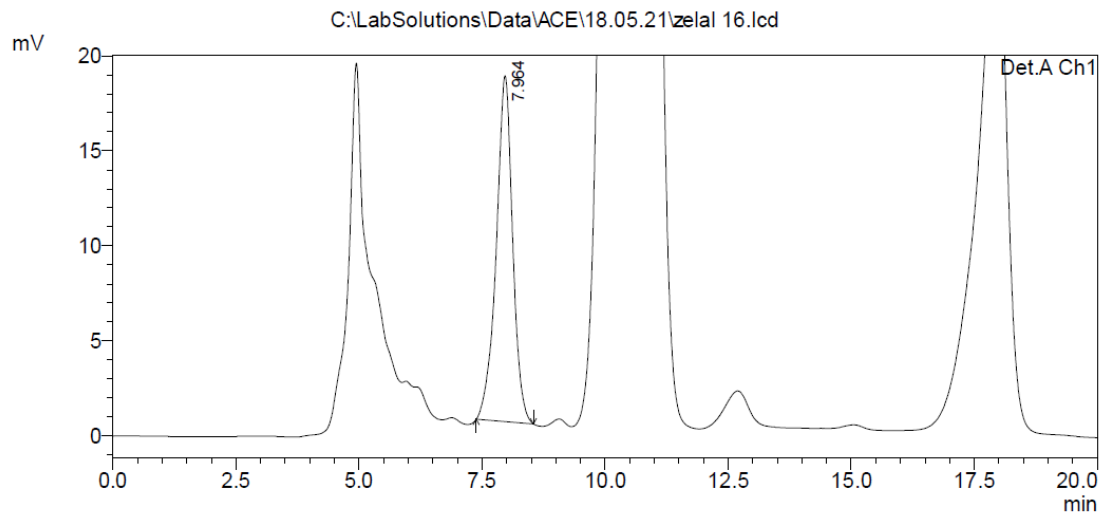


PeakTable

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Area %	Height %
1	8.075	399051	18801	100.000	100.000
Total		399051	18801	100.000	100.000

**EK-16** 250 mM tuz uygulanmış *In vitro* yaprak ekstrelerine ait LC-MS/MS kromatogramı

<Chromatogram>

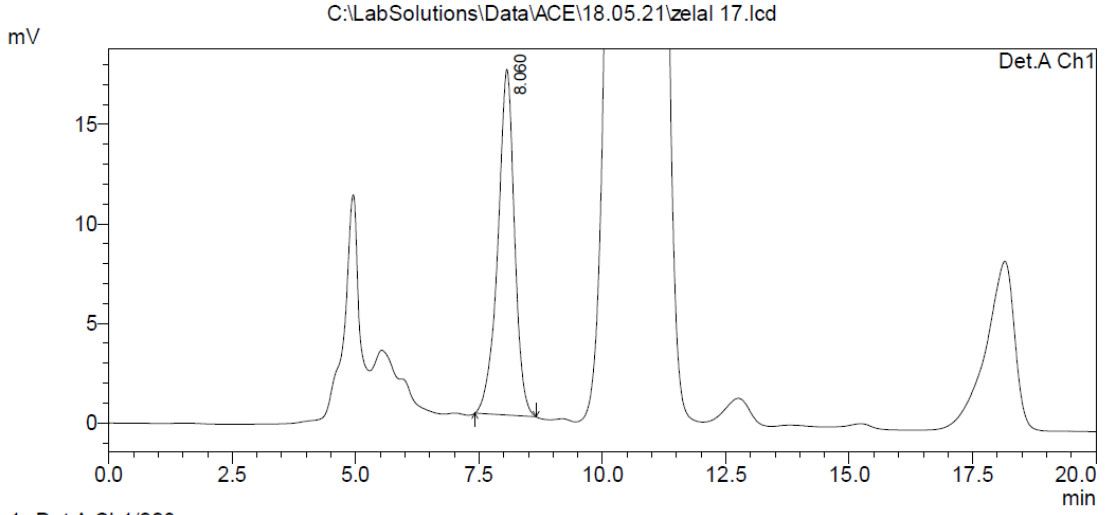


PeakTable

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Area %	Height %
1	7.964	421952	18192	100.000	100.000
Total		421952	18192	100.000	100.000

**EK-17** 250 mM tuz uygulanmış *In vitro* gövde ekstrelerine ait LC-MS/MS kromatogramı

<Chromatogram>



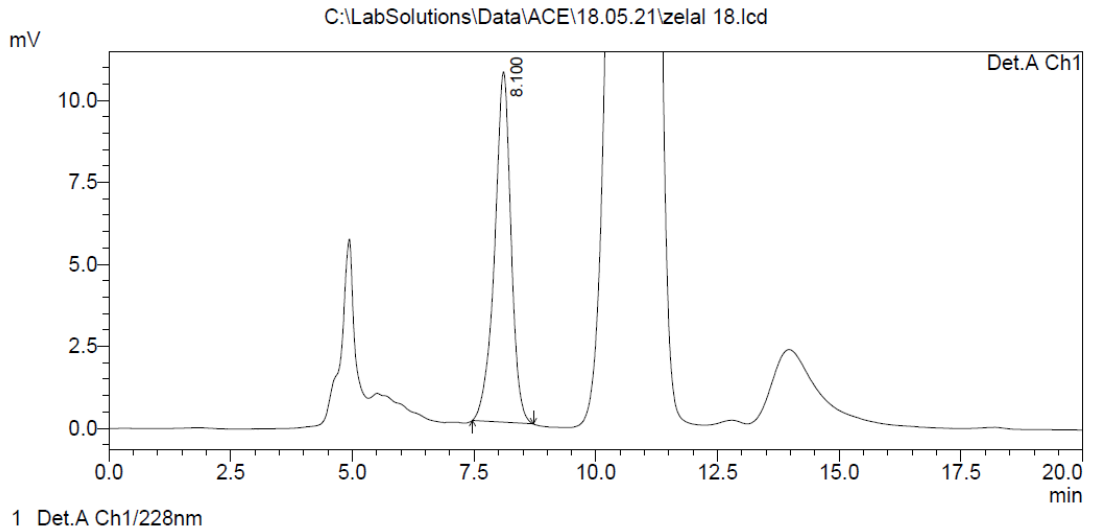
PeakTable

Detector A Ch1 228nm

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Area %	Height %
1	8.060	408544	17362	100.000	100.000
Total		408544	17362	100.000	100.000

**EK-18** 250 mM tuz uygulanmış *In vitro* kök ekstrelerine ait LC-MS/MS kromatogramı

<Chromatogram>



PeakTable

Detector A Ch1 228nm

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Area %	Height %
1	8.100	250421	10675	100.000	100.000
Total		250421	10675	100.000	100.000